

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

**ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, Mi 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]

Université de Sherbrooke

Étude Structurale et Fonctionnelle de la Dimérisation du Récepteur du PAF

Par

Amélie Perron

Département de pédiatrie

Service d'immunologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M. Sc.) en Immunologie

Septembre 2001



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**385 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**385, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74498-1

Canada

Table des Matières

Table des matières	1
Liste des tableaux et schémas.....	4
Liste des figures.....	5
Liste des abréviations.....	7
Résumé.....	9
Mots clés.....	11
 <i>A. Introduction</i>	 12-44
Partie 1 : Récepteurs couplés aux protéines G.....	12-19
Principes généraux.....	12
Activation des GPCRs.....	13
Désensibilisation homologue et hétérologue.....	15-19
Désensibilisation homologue.....	15
Désensibilisation hétérologue.....	16
Les arrestines.....	18
Internalisation.....	20-25
Les GRKs dans la séquestration des GPCRs.....	20
Contribution des arrestines.....	21
Voies alternatives d'internalisation des GPCRs.....	24

Partie 2 : Oligomérisation des GPCRs.....	27-33
Généralités.....	27
Types d'interactions moléculaires.....	28
La dimérisation de récepteurs – un artefact ou une nécessité fonctionnelle	29
Partie 3 : Facteur activateur de plaquettes.....	34-42
Actions physiologiques du facteur activateur de plaquettes.....	34
Le récepteur du PAF.....	37
Signalisation.....	39
Désensibilisation.....	41
Possibilité d'oligomérisation.....	42
Partie 4 : Réticulation induite par la coumermycine.....	43-44
B. <i>Prologue</i> : Objectifs de recherche et stratégies utilisées.....	45-46
C. <i>Article</i> : Agonist-independent desensitization and internalization of the human platelet-activating factor receptor by coumermycin-gyrase B-induced dimerization....	47-87
D. <i>Discussion</i>	88-98
E. <i>Conclusion</i>	99-100
F. <i>Annexe</i>	101-104
G. <i>Remerciements</i>	105
H. <i>Bibliographie</i>	106-123

Liste des Tableaux et Schémas

Tableau 1. Effet du PAF sur les cellules et systèmes de l'homme.....	36
Tableau 2. Méthodes utilisées pour mesurer l'internalisation du hPAFR-GyrB.....	46
.....	
Schéma 1. Représentation de l'activation des protéines G induite par l'attachement d'un agoniste à un récepteur à sept domaines transmembranaires.....	14
Schéma 2. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'internalisation typique des GPCRs.....	23
Schéma 3. Mécanismes d'endocytose des GPCRs.....	26
Schéma 4. Structure chimique du PAF	34
Schéma 5. Représentation du récepteur du PAF humain.....	38
Schéma 6. Mécanismes généraux de transduction du signal du récepteur du PAF.....	40
Schéma 7. Système de réticulation chimique de Raf induite par la coumermycine.....	44

Liste des Figures

Figure 1.	Detection of human PAFR dimers via Western Blotting analysis.....	65
Figure 2.	Expression, binding and signaling of wild-type hPAFR and hPAFR-GyrB receptors.....	66-67
Figure 3.	Coumermycin induces an agonist-independent loss of [³ H]WEB2086 binding to hPAFR-GyrB in stably transfected CHO cells.....	68-70
Figure 4.	Effect of coumermycin on the internalization of hPAFR-GyrB-ligand complex.....	71
Figure 5.	Flow cytometric analysis of coumermycin-induced sequestration of hPAFR-GyrB in CHO cells.....	72-75
Figure 6.	Distribution of β arr-1-GFP and hPAFR-GyrB following stimulation with coumermycin and/or agonist.....	76
Figure 7.	Inositol Phosphate (IP) accumulation during coumermycin-induced internalization of hPAFR-GyrB in CHO cells.....	77
Figure 8.	Effect of protein kinase inhibitors on the coumermycin-induced loss of [³ H]WEB2086 binding sites in CHO cells.....	78

Figure 9. Détection de dimères du récepteur du PAF sensibles aux conditions réductrices.....	102
Figure 10. Effet de la délétion de la queue C-terminale sur la dimérisation du hPAFR.....	103
Figure 11. Formation d'hétérodimères hPAFR/V ₂ R dans les cellules COS-7.....	104

Liste des Abréviations :

4 β -PMA : Forme active du phorbol 12-myristate 13-acétate

β_2 AR : Récepteur β_2 Adrénergique

β ARK-1 : Kinase 1 du récepteur β -adrénergique

β arr : β -arrestine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMPC : Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

AT_{1A}R : Récepteur de l'angiotensine II de type 1A

ATP : Adénosine 5'-triphosphate

BK₂R : Récepteur de la bradykinine de type 2

BSA : Albumine de sérum bovin

CCR : Récepteur de chémokine

D₂R : Récepteur de la dopamine de type 2

DAG : Diacylglycérol

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTT : Dithiotréitol

FBS : Sérum bovin foetal

GABAR : Récepteur de l'acide γ -amino butyrique

GDP : Guanosine 5'-diphosphate

GTP : Guanosine 5'-triphosphate

GPCR : Récepteur couplé aux protéines G

GFP : Protéine fluorescente verte

GRK : Kinase associée aux GPCRs

GyrB : Gyrase B

HA : Hemagglutinine

HIV : Virus d'immunodéficience humain

hPAFR : Récepteur du PAF humain

IAM : Iodoacétamide

IL-.. : Interleukine

IP : Inositol phosphate

JAK : Janus kinase

MAPK : Protéine kinase activée par les mitogènes

MCP-1 : Protéine chémoattractante de monocyte 1

PAF : Facteur activateur de plaquettes

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PKG : Protéine kinase G

PLC : Phospholipase C

PI3K : Phosphatidyl-3-kinase

PAGE : Gel d'électrophorèse de polyacrylamide

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SSTR5 : Récepteur de la somatostatine 5

STAT : Signal de transduction et de l'activation transcriptionnelle

Tyk2 : Tyrosine kinase 2

V₂R : Récepteur de la vasopressine de type 2

RÉSUMÉ

Le facteur activateur de plaquettes (PAF) est un des plus puissants médiateurs phospholipidiques connus jusqu'à présent dont l'activité peut être impliquée dans de nombreuses réponses biologiques pouvant influencer notamment le système nerveux central, cardio-vasculaire, reproducteur, respiratoire et immunitaire par l'entremise d'un récepteur couplé aux protéines G (GPCRs). Parmi sa multitude d'actions physiologiques et pathologiques, le PAF joue un rôle majeur au niveau des réponses immunes médiatrices de l'inflammation. Nous avons précédemment démontré que la coexpression de certains mutants du récepteur du PAF humain (hPAFR) peut être utilisée pour modifier des caractéristiques spécifiques du récepteur de type sauvage comme le niveau d'activité basale, l'affinité pour le ligand ainsi que l'expression de surface (Le Gouill, C., Parent, J.L., Caron, C.A., Gaudreau, R., Volkov, L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12548-12554). Au cours des dernières années, il a été montré que l'oligomérisation des récepteurs, et plus particulièrement la dimérisation peut jouer un rôle important dans les événements moléculaires qui mènent à l'activation et à la régulation des réponses biologiques des GPCRs. Son implication au niveau de l'internalisation des récepteurs n'est toutefois pas encore établie.

Afin d'étudier le rôle de la dimérisation dans le processus d'internalisation des GPCRs, nous avons construit une protéine de fusion hPAFR-GyrB pouvant être dimérisée suite à l'addition de coumermycine. Nous avons ainsi démontré que la dimérisation était à elle seule suffisante pour induire la séquestration du hPAFR-GyrB dans des cellules CHO. L'internalisation du hPAFR-GyrB induite par la coumermycine semble ainsi être possible en l'absence d'agoniste et de l'activation de la phospholipase C (PLC). Des expériences réalisées

à l'aide d'un antagoniste radiomarqué, le [^3H]WEB2086, ont également permis l'observation d'une cinétique de disparition des sites de liaison de l'antagoniste suite au traitement à la coumermycine. Nous avons ensuite démontré par microscopie confocale que la séquestration du récepteur induite par la coumermycine dans des cellules COS-7 semble se produire indépendamment de la translocation des arrestines et de la formation des vésicules de clathrine. Les inhibiteurs de protéine kinase C (PKC) staurosporine et GF109203X peuvent toutefois inhiber la désensibilisation du hPAFR-GyrB induite par la coumermycine, suggérant ainsi l'implication de la PKC dans les mécanismes moléculaires régulant l'internalisation du récepteur indépendante du ligand.

Ces différentes données proposent ainsi un mécanisme alternatif de séquestration des GPCRs induit par la dimérisation qui suggère, par conséquent, un rôle fonctionnel à ce type d'interaction intermoléculaire.

Mots clés :

PAFR, dimérisation, Gyrase B, désensibilisation, internalisation, arrestines, PKC.

A. Introduction :

PARTIE 1 : RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G

PRINCIPES GÉNÉRAUX

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires impliqués dans la transmission de signaux. Chez les vertébrés, cette famille comporte entre 1000-2000 membres (>1% du génome) qui contrôlent les réponses à une variété de transmetteurs chimiques incluant les amines biogènes, les acides aminés, les peptides, les lipides, les nucléosides de même que les polypeptides de grande taille (Gether, 2000). Les GPCRs jouent un rôle primordial dans la régulation de divers processus physiologiques, tels la différenciation et croissance cellulaire, le métabolisme cellulaire, la neurotransmission, ainsi que les réponses inflammatoires et immunes (Bockaert et al., 1999).

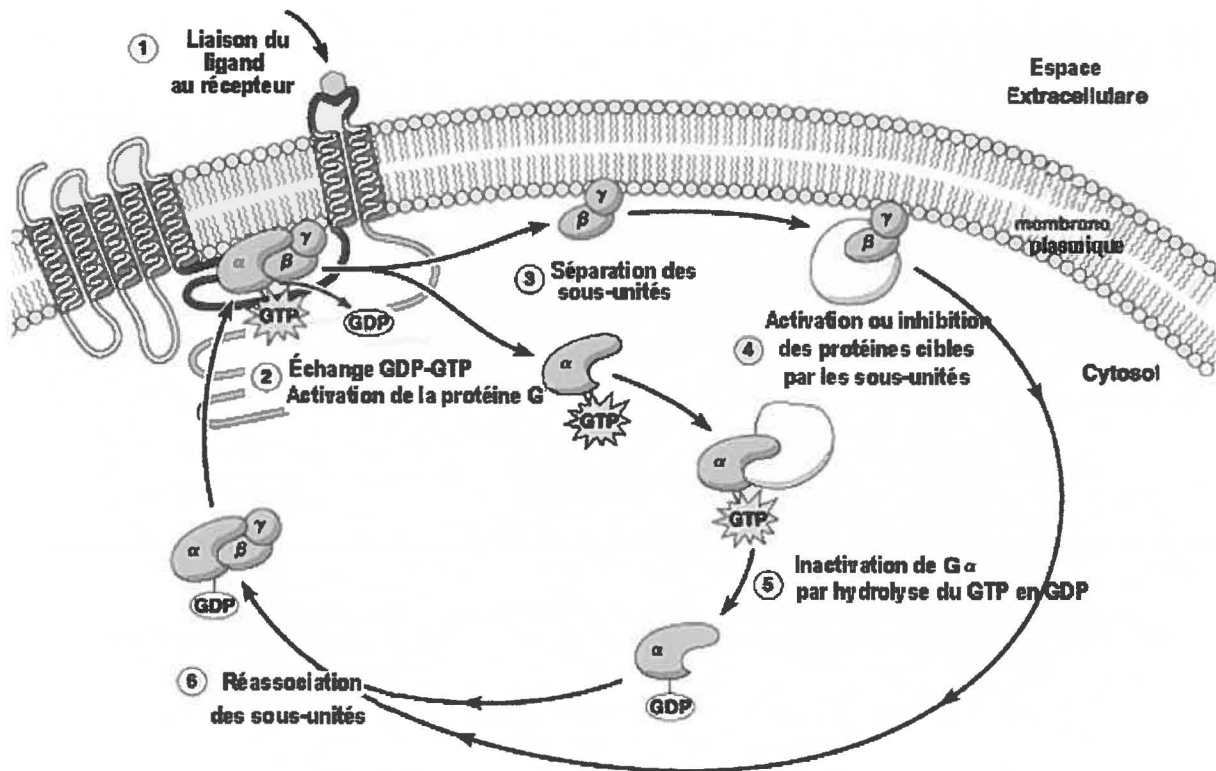
Les GPCRs sont caractérisés par une chaîne polypeptidique qui traverse la membrane plasmique à sept reprises. Ce motif structural est constitué d'hélices α transmembranaires formées chacune de 20-25 résidus hydrophobes qui sont reliées unes à unes par l'alternance de boucles cytosoliques et extracellulaires. On ne note toutefois qu'une faible homologie de séquence entre les différents types de GPCRs au niveau des boucles externes, internes et les queues C- et N-terminales. Leur taille varie aussi considérablement entre les différents GPCRs. Ces récepteurs membranaires ont la particularité de convertir un signal extracellulaire en signal intracellulaire.

En plus de l'activation par le ligand, il existe de nombreux facteurs régulateurs qui peuvent influencer la signalisation des GPCRs en jouant un rôle majeur dans la spécificité et la cinétique des réponses physiologiques aux signaux extracellulaires.

Activation des GPCRs

La signalisation des GPCRs médiée par l'agoniste nécessite tout d'abord l'isomérisation du récepteur vers un état de haute affinité pour le ligand. Ce changement de conformation est médié par l'activation du récepteur par son agoniste qui rend alors possible la formation d'un complexe avec les protéines G hétérotrimériques (Wess, 1997).

Les protéines G qui interagissent avec les GPCRs sont composées de 3 sous-unités distinctes : la sous-unité α portant le site de liaison à la guanine et les sous-unités β et γ qui se présentent sous la forme d'un dimère. Lorsqu'elles sont inactives, les protéines G se retrouvent sous la forme d'un hétérotrimère composé de la sous-unité $\alpha(-\text{GDP})$ et du dimère $\beta\gamma$. La liaison du ligand induit d'abord l'adoption de la conformation active du récepteur et son interaction subséquente avec la protéine G, ce qui provoque alors un changement dans la structure de la sous-unité $G\alpha$, favorisant ainsi l'échange du GDP par un GTP (Gether et al., 1998). Cette étape affecte l'affinité des composantes de la protéine G et provoque, par conséquent, la dissociation de la sous-unité $G\alpha(-\text{GTP})$ du complexe $G\beta\gamma$ (Gilman, 1987). Par la suite, ces deux sous-unités fonctionnelles pourront aller réguler l'activité d'une variété de systèmes d'effecteurs tels que l'adénylate cyclase, les phospholipases ou les canaux ioniques, modulant ainsi les différentes voies de signalisation cellulaires (Hamm, 1998). L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité $G\alpha$ sera ensuite induite par son interaction avec ses différents effecteurs, ce qui amènera l'hydrolyse du GTP en GDP. L'inactivation subséquente de la sous-unité $G\alpha$ causera ensuite sa réassociation avec les $G\beta\gamma$, reformant ainsi l'hétérotrimère inactif (Nürnberg et al., 1996). Les événements généraux de l'activation des protéines G sont résumés au schéma suivant.



©Addison Wesley Longman, Inc.

Schéma 1 : Représentation de l'activation des protéines G induite par l'attachement d'un agoniste à un récepteur à sept domaines transmembranaires. (1) Lors de la liaison du ligand, (2) le changement de conformation du récepteur active la protéine G en causant le relâchement du GDP et la liaison subséquente du GTP. (3) Les sous-unités α et $\beta\gamma$ se séparent ensuite (4) et initient les événements de transduction du signal. (5) L'hydrolyse du GTP par la sous-unité $G\alpha$ inactive la sous-unité $G\alpha$ qui (6) se réassocie avec les sous-unités $\beta\gamma$, reformant ainsi l'hétérotrimère inactif.

DÉSENSIBILISATION HOMOLOGUE ET HÉTÉROLOGUE

Il existe de nombreux mécanismes régissant la durée et la force des signaux des GPCRs. L'activité des GPCRs représente ainsi une balance coordonnée entre les mécanismes moléculaires gouvernant la signalisation, la désensibilisation ainsi que la resensibilisation des récepteurs. Par exemple, l'exposition des GPCRs à l'agoniste peut occasionner une atténuation rapide de la réponse du récepteur, ce qui permet de circonscrire dans le temps les effets d'une stimulation (Böhm et al, 1997). Ce type de mécanisme, appelé désensibilisation, débute dans les secondes qui suivent la stimulation et caractérise principalement les étapes qui contribuent au découplage fonctionnel du récepteur à la protéine G (Ferguson, 2001; Tsao et al., 2000; Lefkowitz, 1998). La désensibilisation est le résultat de l'action de trois familles de molécules régulatrices : les kinases à second messager (protéines kinases A (PKA) et C (PKC)), les kinases spécifiques aux GPCRs (GRKs) et les arrestines.

Désensibilisation homologue

Une modification covalente du récepteur par phosphorylation de résidus sérines/thréonines situés au niveau de la troisième boucle intracellulaire et de la queue cytoplasmique s'avère être l'étape initiale dans l'atteinte de l'état de découplage de nombreux GPCRs (Ferguson et al., 1996; Bouvier et al, 1988; Nakata et al., 1994). On distingue deux formes différentes de désensibilisation : la désensibilisation homologue et hétérologue (Bünemann et al., 1999). Le premier type de désensibilisation est spécifique pour l'activation du récepteur par l'agoniste où la phosphorylation subséquente du récepteur par les GRKs engendre un changement de conformation du récepteur qui le maintient alors dans un état découplé, participant ainsi à sa désensibilisation. La famille des GRKs comporte actuellement

6 membres (GRKs 1-6), dont les plus étudiés sont la rhodopsine kinase (GRK1) et β ARK1 (GRK2). Dans les cellules non stimulées, les GRK1-3 sont localisées au cytosol et ont la particularité de se transloquer à la membrane pour lier les récepteurs membranaires stimulés par l'agoniste. L'activation des GRKs ne dépend normalement pas de la signalisation, cependant, pour les GRK2 et 3, elle semble être directement reliée au relâchement des sous-unités $\beta\gamma$ suite à la stimulation du récepteur (Kosh et al., 1993). Les $\beta\gamma$ favorisent ainsi la translocation de ces kinases à la membrane plasmique où elles pourront ensuite aller phosphoryler le récepteur activé (Inglese et al., 1993). Les GRKs ont également la particularité de ne phosphoryler que les récepteurs en conformation active (Haga et al., 1996; Böhm et al., 1997; Premont et al., 1995). Les kinases à second messenger peuvent toutefois jouer un rôle dans la désensibilisation homologue de certains GPCRs comme dans le cas du récepteur m2 muscarinique où on a noté une phosphorylation à la troisième boucle intracellulaire par la caséine kinase 1a suite à l'activation du récepteur par son agoniste (Ferguson, 2001; Tobin et al., 1997).

Désensibilisation hétérologue

En plus de la désensibilisation spécifique pour l'agoniste, les fonction des GPCRs peuvent également être régulées par différents mécanismes indépendants de l'agoniste. La PKA, activée par les récepteurs couplés à la sous-unité Gs, et la PKC, stimulée par les récepteurs couplés à Gq, participent ainsi à la régulation de ce type de désensibilisation. Les kinases dépendantes de seconds messagers PKA et PKC, sont des phosphotransférases qui catalysent le transfert d'un groupement γ -phosphate de l'ATP à un résidu sérine ou thréonine contenu dans une séquence consensus d'acides aminés. Ce type de désensibilisation est appelé

hétérologue car elle ne résulte pas de l'activation du même récepteur par son agoniste mais plutôt de l'élévation de messagers secondaires comme l'AMPc, le calcium ou le diacylglycérol se produisant notamment suite à la stimulation du récepteur. Ces différents changements peuvent alors mener à l'activation de la PKA et/ou PKC, et à la phosphorylation subséquente de protéines cibles suivant la voie de signalisation. De plus, ces kinases peuvent réguler négativement la réponse du récepteur par phosphorylation aux sites consensus à l'intérieur de la troisième boucle intracellulaire ainsi qu'à l'extrémité C-terminale et ce, sans spécificité par rapport aux récepteurs occupés par le ligand (Bünemann et al., 1999; Hausdorff et al., 1990).

Ainsi, des études précoces concernant le β_2 AR ont démontré que toute condition amenant une élévation de l'AMPc peut causer la phosphorylation du récepteur par la PKA et son découplage de la protéine G stimulatrice Gs, empêchant alors l'activation de l'adénylate cyclase (Lohse et al., 1990, 1992). Des études ont également démontré que l'activation de la PKC peut mener à la phosphorylation et à la désensibilisation de nombreux GPCRs couplés à $G_{\alpha i}$ ou $G_{\alpha q}$ (Diviani et al, 1997; Liang et al, 1998; Tang et al, 1998). Par exemple, la phosphorylation du récepteur opioïde δ par la PKC s'est avérée être un mécanisme de régulation hétérologue des fonctions du récepteur et ce, indépendamment de la présence de l'agoniste (Xiang et al, 2001). On a également noté que l'activation de la PKC suffit à l'enclenchement du processus d'internalisation du récepteur de la somatostatine 2 (Hipkin et al., 2000), ce qui appuie une fois de plus le rôle de la désensibilisation hétérologue dans la régulation de la réponse des GPCRs.

La désensibilisation hétérologue a donc comme conséquence de phosphoryler non seulement les récepteurs activés par l'agoniste, mais aussi ceux n'ayant pas été exposés au

ligand (Hausdorff et al, 1989, Lohse et al., 1990b). Ce type de phosphorylation indépendante de l'agoniste est une propriété qui n'a généralement été attribuée qu'aux protéines kinases dépendantes des seconds messagers et non aux GRKs (Lefkowitz, 1993).

Les mécanismes de désensibilisation médiés par les kinases dépendantes de seconds messagers ont cependant suscité moins d'attention que ceux régulés par les GRKs. Quelques études ont ainsi tenté d'élucider les mécanismes responsables de ce type de désensibilisation (Winstel et al., 1996; Chuang et al., 1995). On a notamment montré que la GRK2 peut être stimulée par une phosphorylation médiée par la PKC, ce qui augmente alors son association à la membrane plasmique. Une autre étude a toutefois démontré que l'activité kinase de la GRK5 pouvait être complètement inhibée suite à une phosphorylation par la PKC (Pronin et al., 1997). Les kinases à second messager peuvent également contribuer à la phosphorylation de composantes de signalisation comme les sous-unités $G\alpha$ et les phospholipases (Ryu et al., 1990; Fields et al., 1995; Ali et al., 1997).

Les arrestines

La phosphorylation de la rhodopsine ou du β_2 AR médiée par les GRKs n'est toutefois pas suffisante pour promouvoir un état d'inactivation complet de ces GPCRs et le découplage fonctionnel total nécessite, par conséquent, une composante additionnelle ou un "agent d'arrêt". Cette protéine d'arrêt a initialement été isolée à partir de segments externes de bâtonnets de la rétine où une protéine de 48 KDa, maintenant appelée arrestine, a été démontrée comme étant capable de lier la forme de la rhodopsine activée par la lumière (Pfister et al., 1985). Par la suite, une arrestine présentant une homologie avec l'arrestine visuelle, la

β -arrestine 1, a été définie en tant que cofacteur nécessaire pour la désensibilisation du β_2 AR médiée par la GRK2 in vitro (Benovic et al., 1987).

La famille des arrestines comporte maintenant 4 membres. Les arrestines visuelles et celles de bâtonnets sont localisées dans le système visuel, tandis que les arrestines 2 et 3 (aussi appelées β -arrestine 1 et β -arrestine 2) sont distribuées de façon ubiquitaire. Les mécanismes par lesquels les arrestines contribuent à la désensibilisation des GPCRs semblent impliquer à la fois le découplage physique des GPCRs des protéines G (arrestines visuelles et β -arrestines) et le ciblage des GPCRs pour l'endocytose (β -arrestines). Des études in vitro ont aussi démontré que la phosphorylation du β_2 AR par les GRKs augmente l'affinité de la liaison des β -arrestines de 10-30 fois, tandis que l'occupation du récepteur par l'agoniste démontre un effet moins significatif sur l'affinité de l'interaction (Lohse et al., 1992; Gurevich et al., 1995). Les arrestines se lient ainsi de façon préférentielle aux GPCRs activés par l'agoniste et phosphorylés par les GRKs en opposition aux récepteurs non phosphorylés ou phosphorylés par les kinases dépendantes des seconds messagers (Lohse et al., 1990b, 1992). La désensibilisation est alors le résultat de la liaison des β -arrestines au récepteur qui cause ensuite le découplage des protéines G par encombrement stérique, prévenant donc les interactions subséquentes des GPCRs avec celles-ci (Krupnick et al., 1998).

INTERNALISATION

L'habileté d'une cellule à répondre à un ligand nécessite la présence de récepteurs qui sont localisés à la membrane plasmique de façon appropriée afin de permettre une interaction de haute affinité avec l'agoniste présent dans le fluide extracellulaire. La réponse de la cellule cible est ainsi dépendante de la distribution des récepteurs. L'occupation des GPCRs par leur agoniste stimule généralement leur internalisation dans les minutes qui suivent la stimulation (Koenig et al., 1997).

Les GRKs dans la séquestration des GPCRs

De nombreuses évidences démontrent maintenant l'implication cruciale de la phosphorylation des GPCRs catalysée par les GRKs dans l'internalisation de plusieurs récepteurs heptahélicoïdaux (Ferguson et al., 1996). Par exemple, dans le cas du récepteur m2 muscarinique, la surexpression de la GRK2 augmente la séquestration du récepteur dans des cellules COS, tandis qu'un dominant négatif de cette même kinase la retarde (Tsuga et al., 1994). Des résultats similaires ont été obtenus avec le β_2 AR. On a ainsi remarqué que la surexpression de la GRK2 pouvait rétablir l'internalisation du récepteur mutant Y326A dont l'affinité pour les GRKs était altérée, empêchant alors l'internalisation normalement induite par l'agoniste (Ferguson et al., 1995). La caractérisation de la phosphorylation du Y326A a révélé une phosphorylation maximale atténuée de 75% par rapport au récepteur de type sauvage qui semble être en partie médiée par la PKA (Ferguson et al., 1995). Il est également intéressant de noter que dépendamment du type de GPCRs étudié, la phosphorylation médiée par les GRKs n'est pas une composante absolue au processus d'internalisation (Bouvier et al., 1988; Hausdorff et al., 1989; Ferguson et al., 1995). Ce type de modification covalente semble

plutôt jouer un rôle étendu dans la séquestration du β_2 AR induite par l'agoniste, amenant l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation par la GRK2 pourrait ainsi stabiliser un état conformationnel requis pour promouvoir l'interaction des GPCRs avec certains éléments de la machinerie cellulaire favorisant directement l'internalisation du récepteur. Par conséquent, les mutants du β_2 AR dont les sites pour la phosphorylation médiée par les GRKs avaient été enlevés doivent être capables d'interagir avec une protéine adaptatrice endocytaire, même en l'absence de phosphorylation (Ferguson et al., 1995).

Une étude supplémentaire a aussi démontré que l'atténuation ou l'abolition de l'habileté du β_2 AR à être phosphorylé par la GRK2 était reliée avec la liaison de la β -arrestine au récepteur (Menard et al., 1997). On a ainsi noté que la surexpression de la β -arrestine pouvait induire une augmentation de l'internalisation du mutant Y326A. Celle-ci était cependant fortement accrue à la suite de la coexpression de la GRK2 (Menard et al., 1997). Le rôle majeur des GRKs dans le processus d'internalisation des GPCRs semble ainsi découler de la phosphorylation du récepteur qui facilite ainsi la liaison des β -arrestines. La phosphorylation par les GRKs augmente donc l'affinité du β_2 AR pour les β -arrestines qui, en plus de découpler le récepteur des protéines G hétérotrimériques, agit comme une protéine adaptatrice d'endocytose pour les GPCRs (Ferguson et al., 1996b, Zhang et al., 1996).

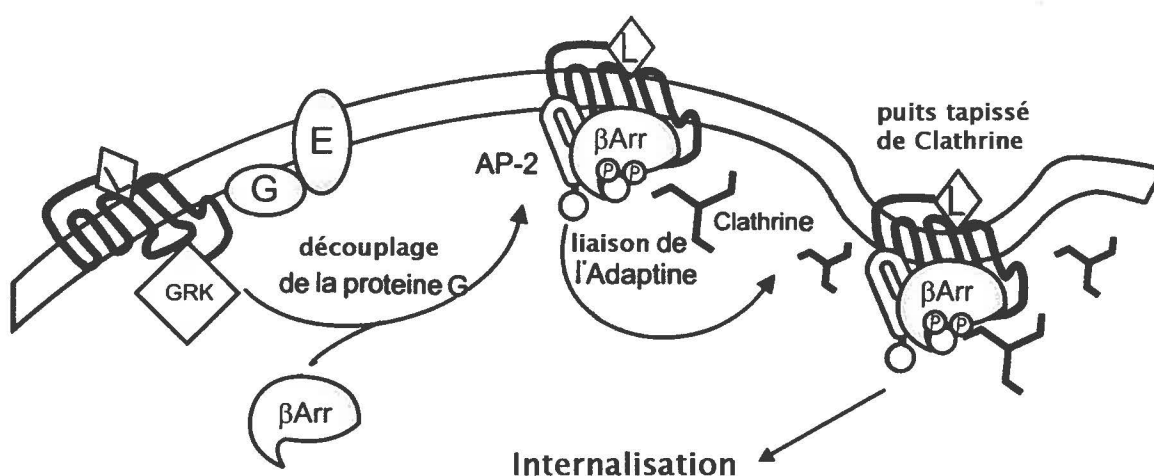
Contribution des arrestines

La première évidence démontrant la contribution des β -arrestines dans l'internalisation des GPCRs par les vésicules de clathrine vient d'une étude où l'effet de mutant dominants négatifs de β -arrestine et de dynamine a été évalué sur la séquestration du β_2 AR et du récepteur

de l'angiotensine II de type 1A (AT_{1A}R). La dynamine est une GTPase de haut poids moléculaire impliquée dans la formation des vésicules de clathrine à partir de la membrane plasmique (Damke et al, 1994). Il a ainsi été démontré que l'expression du mutant de dynamine (K44A) sans activité GTPasique ou l'expression d'une β -arrestine non fonctionnelle était suffisante pour empêcher l'internalisation du β_2 AR sans toutefois influencer celle du AT_{1A}R (Zhang et al, 1996). La création d'une protéine de fusion reliant la protéine fluorescente verte (GFP) à la β -arrestine 2 a ensuite permis la visualisation par microscopie confocale de la translocation des β -arrestines à la membrane plasmique suite à la stimulation du β_2 AR par son agoniste (Barak et al., 1997). On a également noté la colocalisation du β_2 AR et β -arrestines dans les vésicules de clathrine (Goodman et al., 1996). L'idée que les β -arrestines ciblent spécifiquement les GPCRs pour l'endocytose via les vésicules de clathrine a été confirmée par de récentes études démontrant l'interaction directe des β -arrestines avec les composantes de la machinerie endocytaire impliquées dans la formation des cages de clathrine (Goodman et al., 1996; Laporte et al., 1999, 2000). Les β -arrestines se lient ainsi à la fois à la chaîne lourde de la clathrine et à la sous-unité du complexe hétérotétramérique du complexe de la molécule adaptatrice AP-2.

Le mécanisme régulant cette réponse médiée par le récepteur n'a toutefois pas encore été élucidé. On ne sait toujours pas si la translocation des β -arrestines est un processus passif impliquant des interactions de diffusion ou bien si elle résulte plutôt d'un signal à partir du récepteur. La fonction de la β -arrestine 1 dans la séquestration des GPCRs semble néanmoins être régulée par des étapes de phosphorylation/déphosphorylation (Lin et al., 1997). Le recrutement et la déphosphorylation médiées par l'agoniste transforment la β -arrestine 1 en

molécule adaptatrice pour la clathrine, contribuant ainsi au mécanisme d'endocytose du β_2 AR. En l'absence de stimulation, la β -arrestine 1 est plutôt localisée au cytoplasme sous une forme constitutivement phosphorylée sur une Ser-412, à son extrémité C-terminale. La nature de la kinase responsable de cette phosphorylation reste toutefois inconnue.



Adapté de Ferguson, 2001.

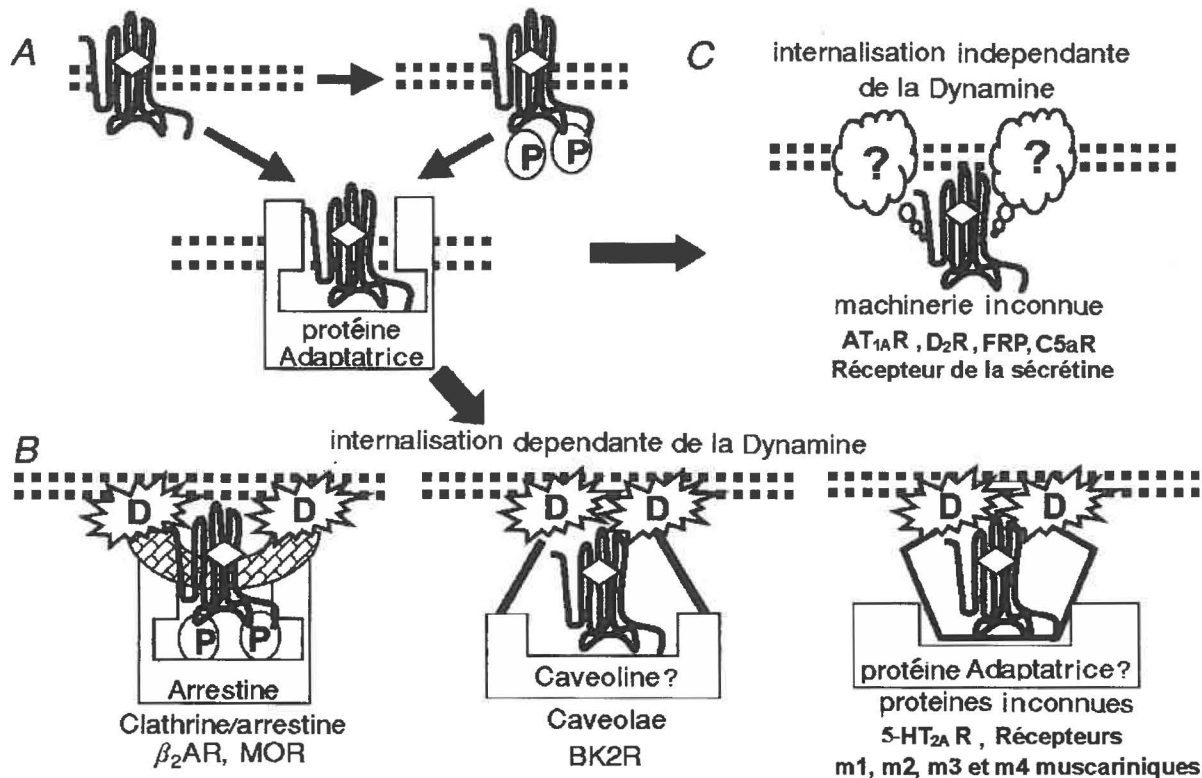
Schéma 2 : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'internalisation typique des GPCRs. L'activation des GPCRs mène à la phosphorylation des résidus sérine et thréonines intracellulaires du récepteur par les GRKs et facilite ainsi la translocation et la liaison de la β -arrestine au récepteur. Les β -arrestines, via leur association avec la sous-unité adaptine de la protéine adaptatrice AP-2, ciblent les GPCRs vers les puits tapissés de clathrine. En plus de leur association avec l'adaptine, les β -arrestines se lient également à la clathrine. Le récepteur est subséquemment internalisé via les vésicules de clathrine. AP-2, complexe adaptateur hétérotétramérique AP-2; β Arr, β -arrestine; L, ligand; P, groupement phosphate.

Voies alternatives d'internalisation des GPCRs

Les mécanismes précis d'internalisation des GPCRs restent toutefois un sujet de controverse. De plus en plus d'évidences démontrent que les GPCRs n'internalisent pas nécessairement tous d'une façon dépendante des β -arrestines/dynamine comme proposé dans le modèle prototypique d'internalisation du β_2 AR (Freedman et al., 1996) notamment emprunté par de nombreux GPCRs comme le CCR5 et le récepteur μ opioïde (Aramori et al., 1997; Zhang et al., 1997) (voir schéma 2). Cette hypothèse a été émise venant du fait que le profil d'internalisation d'un même récepteur peut varier en fonction du type cellulaire dans lequel il est exprimé (Zhang et al., 1996) et de l'observation selon laquelle l'internalisation de certains GPCRs est moins sensible aux effets de mutants dominant négatifs de dynamine ou de β -arrestines. Par exemple, dans le cas du AT_{1A} R et du récepteur m2 muscarinique, la coexpression de mutants dominants négatifs de β -arrestines ou de dynamine ne bloque pas l'internalisation médiée par l'agoniste, suggérant ainsi un mode d'internalisation indépendant des β -arrestines et de la dynamine (Zhang et al., 1996; Vogler et al., 1999, Pals-Rylaarsdam et al., 1997). Différents sous types du récepteur muscarinique (m1, m3 et m4) semblent également emprunter un mécanisme supplémentaire d'internalisation dans les cellules HEK293 qui, cette fois-ci, est dépendant de la dynamine et indépendant des β -arrestines (Lee et al., 1998; Vogler et al., 1998). Par contre, l'internalisation des récepteurs de la dopamine D_2 (Vickery et al., 1999), de la sécrétine (Walker et al., 1999) et du peptide N-Formyl et C5a (Gilbert et al., 2001) manifeste plutôt une insensibilité à l'expression du mutant dominant négatif de dynamine K44A. La machinerie cellulaire responsable de ce type d'internalisation indépendante à la fois des β -arrestines et de dynamine reste toutefois inconnue.

Une étude plus récente a toutefois prouvé que l'internalisation du m2 muscarinique fait preuve d'une sensibilité atypique à la dynamine (Werbonat et al., 2000) contrairement à ce qui avait précédemment été avancé (Vogler et al., 1999). Cette observation a été obtenue à l'aide d'un différent mutant dominant négatif de la dynamine, le K535M, dont les trois motifs de liaison au GTP ont été enlevés comparativement à un seul dans le cas du mutant K44A. Le type de mutant de dynamine utilisé peut ainsi faire varier considérablement les interprétations concernant les mécanismes d'internalisation utilisés.

Même si l'identité de mécanismes de séquestration indépendants de la clathrine reste à être élucidée, il est intéressant de voir que certains GPCRs semblent être associés aux caveolae. Par exemple, le récepteur de l'endothéline de type A (Chun et al., 1994) et le récepteur m2 muscarinique (Feron et al., 1997) peuvent être respectivement localisés dans les caveolae des cellules de muscle lisse et dans les myocytes cardiaques suite à une stimulation avec leur agoniste. La localisation et/ou internalisation du récepteur de la bradykinine B₂ peut également se produire via les caveolae mais nécessite toutefois la présence de la dynamine pour la fission de la membrane cellulaire (De Weerd et al., 1997). Le rôle de la cavéoline en tant que protéine adaptatrice reste cependant à être démontré. Les différentes voies d'internalisation des GPCRs sont résumées sur le schéma suivant.



Modifié de Bünemann et al., 1999

Schéma 3 : Mécanismes d'endocytose des GPCRs. A, Suite à la liaison de l'agoniste au récepteur, plusieurs GPCRs subissent une phosphorylation (P) par les GRKs ou autres protéines kinases. La phosphorylation peut servir de signal pour la liaison subséquente de certaines protéines adaptatrices mais d'autres mécanismes peuvent toutefois être opérants et pourraient impliquer la liaison de protéines adaptatrices indépendantes de la phosphorylation ou de l'association directe des GPCRs avec la machinerie endocytique. B, Certaines voies d'internalisation sont dépendantes de la dynamine (D) et utilisent les arrestines comme protéines adaptatrices pour l'internalisation médiée par les vésicules de clathrine comme démontré pour le récepteur β_2 adrénergique (β_2 AR) et récepteur opioïde μ (MOR). Le récepteur de la bradykinine 2 (BK2R) est internalisé via les caveolae selon un mécanisme dépendant de la dynamine. Les récepteurs m1, m2, m3 et m4 muscariniques et le récepteur de la sérotonine (5-HT_{2A}R) sont internalisés selon un mécanisme dépendant de la dynamine mais indépendant des arrestines. C, Une voie d'internalisation indépendante de la dynamine a été observée pour les récepteurs de l'angiotensine II 1A (AT_{1A}R), dopamine D₂ (D₂R), sécrétine, peptide N-Formyl (FRP) et C5a (C5aR).

PARTIE 2 : OLIGOMÉRIISATION DES GPCRs

GÉNÉRALITÉS

Des études entreprises lors de ces deux dernières décennies ont apporté plusieurs informations sur les événements biochimiques impliqués dans la signalisation cellulaire par l'intermédiaire des GPCRs. Cependant, la compréhension des interactions moléculaires ligand-récepteur et plus particulièrement des mécanismes structuraux d'activation ou d'inhibition reste encore très élémentaire. La majorité de ces études dans ce domaine se sont concentrées sur la détermination des régions du récepteur responsables de l'affinité de la liaison pour l'agoniste. Bien que cette étape fait partie des tout premiers événements dans l'action du ligand, elle ne tient toutefois pas compte de la traduction de cette liaison en une réponse physiologique, qui constitue en soi le seul déterminant ayant une utilité thérapeutique. Les modèles traditionnels décrivant l'interaction des GPCRs avec les protéines G sont basés sur l'assomption que les récepteurs existent en tant que monomères et couplent les protéines G selon une stoechiométrie de 1 : 1. Plusieurs études ont démontré une coopérativité dans la liaison d'agonistes aux GPCRs, proposant ainsi l'existence d'un ordre oligomérique de récepteurs. (Mattera et al., 1985; Willardson et al., 1993; Sinkins et al., 1993; Potter et al., 1991; Avissar et al., 1983; Wreggett et al., 1995). Au cours des dernières années, il a aussi été montré que l'oligomérisation des récepteurs peut jouer un rôle important dans les événements moléculaires menant à l'activation des GPCRs, faisant ainsi appel à un mécanisme plus complexe que le modèle classique de couplage des récepteurs aux protéines G.

TYPES D'INTERACTIONS MOLÉCULAIRES

La première évidence directe de dimérisation a été amené pour le β_2 AR par Hebert et collaborateurs à l'aide d'études de coimmunoprécipitation différentielle de récepteurs étiquetés avec deux épitopes différents (Hebert et al., 1996). Les résultats démontrèrent également la présence de dimères résistants au SDS originaires d'une interaction non-covalente au niveau du sixième domaine transmembranaire. Des résultats similaires ont été obtenus pour le récepteur de la dopamine D_2 (D_2R) à l'aide de peptides dérivés des domaines transmembranaires VI et VII (Ng et al., 1996). La dimérisation démontre toutefois une spécificité intrinsèque au récepteur car les peptides dérivés du β_2 AR n'ont pas d'effet sur la dimérisation du D_2R (Ng et al., 1996). L'analyse de la séquence du sixième domaine transmembranaire du β_2 AR a révélé la présence partiellement conservée du motif de dimérisation (⁷⁵LIXXGVXXG⁸¹VXXT) proposé pour la glycophorine A (MacKensie et al., 1997). Cette hypothèse a ensuite été confirmée par le fait que contrairement au sixième domaine transmembranaire décrit plus tôt, un même peptide dont les glycines du motif ont été remplacées par d'autres résidus ne démontre que très peu d'effets sur la dimérisation du β_2 AR (Hebert et al., 1996). Ce motif de dimérisation n'est cependant pas conservé chez un grand nombre de GPCRs et ne semble pas être un élément décisif pour la dimérisation des GPCRs tels que les récepteurs de la dopamine D_1 (George et al., 1998), D_2 (Ng et al., 1996) et D_3 (Nimchinsky et al., 1997), les récepteurs muscariniques m_2 (Potter et al., 1991) et m_3 , (Zeng et al., 2000), les récepteurs des chémokines CCR2b, CCR4 et CCR5 (Rodriguez-Frade et al., 1999, 1999b), le récepteur senseur du calcium (Zhang et al., 2001) ainsi que le récepteur du glutamate métabotropique de type 5 (Romano et al., 1996).

Les mécanismes moléculaires responsables de la formation de dimères semblent également différer de façon considérable entre les récepteurs. Par exemple, la dimérisation du récepteur δ -opioïde est éliminée suite à une délétion de 15 acides aminés de la queue cytoplasmique, suggérant ainsi l'implication de celle-ci dans la dimérisation de ce récepteur (Cvejic et al., 1997). L'implication de ponts disulfures s'est également montrée nécessaire à la dimérisation du récepteur du glutamate métabotropique de type 5 (Romano et al., 1996) et du récepteur senseur du calcium extracellulaire (Bai et al., 1998) où l'interaction semble intervenir au niveau des cystéines du domaine extracellulaire. Le dernier type d'interaction répertorié jusqu'à maintenant semble impliquer la formation d'hélices alpha entre les queues C-terminale du GABA_BR1 et R2 (White et al., 1998; Kunner et al., 1999).

LA DIMÉRISATION DE RÉCEPTEURS – UN ARTEFACT OU UN NÉCESSITÉ FONCTIONNELLE ?

Les premiers éléments concernant une relation potentielle entre la dimérisation et l'activation des GPCRs ont été obtenus à l'aide d'un récepteur mutant dont les capacités de liaison du ligand étaient altérées (Monnot et al., 1996). La coexpression de deux formes mutantes du récepteur de l'angiotensine II s'est ainsi montrée suffisante à la restauration du site de liaison du ligand, mettant ainsi en évidence l'implication structurale potentielle de ce type d'interaction intermoléculaire (Monnot et al., 1996). D'une façon similaire, la coexpression du récepteur de type sauvage du β_2 AR avec une forme mutante du récepteur constitutivement désensibilisée (C341G) semble avoir un effet dominant positif, résultant en la complémentation fonctionnelle du récepteur mutant dont les propriétés de signalisation étaient initialement altérées (Hebert et al., 1998). Le potentiel thérapeutique de ce phénomène a d'ailleurs été évalué avec le récepteur de la vasopresine V_2 où on a démontré qu'une forme

inactive du récepteur présente chez les patients souffrant de diabète néphrogénique insipide pouvait être fonctionnellement rétablie suite à la coexpression d'un fragment correspondant à la queue C-terminale du récepteur de type sauvage (Schöneberg et al., 1996). Ces différentes études de complémentation fonctionnelle suggèrent que la dimérisation pourrait ainsi avoir un rôle direct dans le mécanisme d'activation du récepteur ou, alternativement, dans la désensibilisation subséquente médiée par l'agoniste ainsi que dans le processus d'internalisation.

Pour le récepteur CCR2b, des évidences suggèrent que la dimérisation joue un rôle direct dans l'activation du récepteur médiée par l'agoniste (Rodriguez-Frade, 1999b). Tout d'abord, il a été démontré que le récepteur du CCR2b est uniquement activé par la forme bivalente d'un anticorps contre le CCR2b et non par les fragments Fab monovalents correspondants. De plus, la coexpression de la forme sauvage du CCR2b avec une forme non couplée aux protéines G (Y139F) empêche toute forme de couplage fonctionnel en réponse à l'agoniste endogène du CCR2b, la protéine 1 chémoattractante de monocytes (MCP-1). Le mutant agit ainsi comme un dominant négatif, proposant alors que la dimérisation semble être un préalable pour la signalisation induite par le ligand du CCR2b. Il existe également une évidence qui supporte le rôle de la dimérisation dans l'activation du récepteur senseur du calcium (Pace et al., 1999). Dans cette étude, l'élimination de deux cystéines étant potentiellement impliquées dans la formation d'un pont disulfure intermoléculaire résulte en un récepteur avec une plus faible affinité pour le calcium et une cinétique plus lente en réponse au calcium. De plus, il a été observé que la forme dimérique du β_2 AR (Hebert et al., 1996) et des récepteurs de chémokines CCR2b, CCR4 et CCR5 (Rodriguez-Fade et al., 1999, 1999b) peut être stabilisée par l'agoniste. Il n'y a toutefois pas de règle universelle concernant le rôle de la dimérisation dans l'activation

des GPCRs. Dans le cas du récepteur m3 muscarinique, par exemple, il a été observé que le niveau de dimères est insensible au carbachol (Zeng et al., 1999), suggérant ainsi que les GPCRs peuvent exister sous une forme dimérique indépendamment du ligand. D'une façon opposée, il a été démontré qu'un agoniste du récepteur δ -opioïde, le Dadle, semble plutôt favoriser la forme monomérique du récepteur (Cvejic et al., 1997).

Bien que les dernières données élaborées sont consistantes avec l'idée selon laquelle la dimérisation pourrait être un élément clé dans l'activation des GPCRs, le rôle de la dimérisation dans les événements subséquents de régulation pourrait potentiellement être imaginé. Les évidences concernant ce domaine d'études semblent toutefois contradictoires. Par exemple, dans le cas du β_2 AR, on s'attendrait ainsi à ce que le niveau de dimérisation soit influencé par un mutant qui est constitutivement désensibilisé (C341G). Les données obtenues relatent toutefois que la dimérisation et la désensibilisation sont deux phénomènes indépendants car la forme mutante du récepteur semble former des dimères d'une façon similaire au récepteur de type sauvage (Hebert et al., 1998). Un phénomène différent a cependant été observé pour le récepteur δ -opioïde où la dimérisation semble être impliquée dans l'internalisation du récepteur (Cvejic et al., 1997). Cette affirmation est principalement basée sur une corrélation entre l'incapacité d'un agoniste, la morphine, à induire l'internalisation du récepteur (Keith et al., 1996; Law et al., 1994) avec son inaptitude à causer une monomérisation du récepteur (Cvejic et al., 1997). Il a également été observé que la délétion des 15 derniers acides aminés du récepteur δ -opioïde réduit considérablement à la fois sa dimérisation et son internalisation, ce qui suggère que ces deux phénomènes nécessitent des déterminants moléculaires proches et que l'interconversion entre la forme dimérique et

monomérique du récepteur pourrait jouer un rôle important dans l'internalisation du récepteur δ -opioïde (Cvejic et al., 1997).

Depuis peu, on assiste à une accumulation d'observations considérables concernant la possibilité d'assemblage hétérodimériques de GPCRs. La toute première évidence remonte en 1998 où trois équipes différentes ont démontré que la coexpression de deux sous-types du récepteur GABA_B soit le type 1 et 2, était nécessaire à la formation d'un récepteur fonctionnel (Jones et al., 1998; White et al., 1998; Kaupmann et al., 1998). L'hétérodimérisation semblerait ainsi favoriser l'expression de surface du GABA_B R1 qui n'est que très faiblement exprimé sans la présence du GABA_B R2 (Möhler et al., 1998). D'autres évidences démontrent que les récepteur opioïdes peuvent, eux aussi, former des hétérodimères (Jordan et al., 1999; Gomes et al., 2000). L'hétérodimérisation des sous types κ et δ du récepteur opioïde résulte en un nouveau sous-type du récepteur opioïde avec des propriétés de liaison et de fonction uniques (Jordan et al., 1999). L'hétérodimérisation des sous types μ et δ semble, tant qu'à elle, être à l'origine de la synergie entre ces deux sous-types de récepteurs précédemment rapportée dans la littérature (Traynor et al., 1993). L'hétérodimérisation des récepteurs μ et δ opioïdes pourrait ainsi expliquer le développement plus tardif d'une tolérance et dépendance à la morphine observé chez des souris traitées avec des antagonistes du récepteur δ (Abbelhamid et al., 1991; Zhu et al., 1999).

L'existence d'hétérodimères a également été rapportée entre le récepteur angiotensine I et celui de la bradykinine B₂ (AbdAlla et al., 2000), constituant ainsi le tout premier exemple d'accroissement du signal par hétérodimérisation de deux récepteurs d'hormones vasoactives différentes. Une augmentation de l'activité fonctionnelle semble également être médiée par

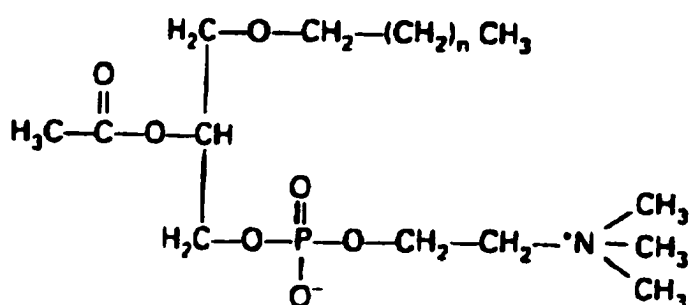
l'hétérodimérisation du D₂R avec le récepteur de la somatostatine de type 5 (SSTR5) (Rocheville et al., 2000). L'oligomérisation entre les récepteurs opioïdes δ et κ avec le β_2 AR semble, tant qu'à elle, avoir un rôle dans l'activation des MAP kinases (Jordan et al., 2001).

PARTIE 3 : FACTEUR ACTIVATEUR DE PLAQUETTES

Les phospholipides sont une composante majeure de la membrane plasmique. Ils sont aussi une importante source d'acide arachidonique, précurseur des eicosanoïdes. Certains phospholipides comme l'acide lysophosphatidique, la sphingosine-1-phosphate et le facteur activateur de plaquettes (PAF) semblent également avoir des fonctions biologiques spécifiques.

ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DU FACTEUR ACTIVATEUR DE PLAQUETTES

Le facteur activateur de plaquettes (PAF) est un médiateur phospholipide aux actions physiologiques puissantes et diverses (Snyder, 1990; Venable et al., 1993). Le PAF a initialement été défini suite à l'identification de la substance relâchée par les basophiles stimulés aux IgE caractérisée comme étant responsable de l'agrégation des plaquettes (Benveniste et al., 1972). Il a cependant fallu attendre 7 ans pour élucider sa structure chimique se définissant comme suit : 1-*o*-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Demopoulos et al., 1979; Blank et al., 1979; Benveniste et al., 1979). Il est intéressant de noter que chacune des caractéristiques structurales du PAF est importante pour une activité biologique optimale de même que pour la stéréospécificité de sa réponse.



(Ishii et al., 2000)

Schéma 4 : Structure chimique du PAF (1-*O*-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine)

$n = 15-17$.

Le PAF est un médiateur de communication entre cellules qui peut agir à la fois comme messager sur la cellule productrice ou sur une cellule adjacente (Chao et al., 1993). Certaines de ses actions peuvent se manifester à des concentrations aussi faibles que 10^{-12} M et incluent des événements apparentés au développement de nombreuses réponses physiologiques et pathologiques (Ishii et al., 2000).

Le PAF est synthétisé par une variété de cellules médiatrices de l'inflammation comme les monocytes, macrophages, neutrophiles, éosinophiles, basophiles et plaquettes (Camussi et al., 1990; Lotner et al., 1980; Triggiani et al., 1991). Les cellules endothéliales peuvent également produire du PAF suite à une stimulation par des médiateurs inflammatoires comme la thrombine, l'angiotensine II, la vasopressine, les leucotriènes C_4 et D_4 , l'histamine et la bradykinine (Camussi et al., 1983; McManus et al., 1985).

Le relâchement de ce phospholipide a des effets pro-inflammatoires significatifs, résultant en l'activation de monocytes, mastocytes, neutrophiles et plaquettes, ce qui provoque la dégranulation de ces cellules avec les conséquences propres à chacune d'entre elles. Avec le chimiotactisme et l'effet autologue qu'il exerce sur ces mêmes cellules, le PAF contribue au maintien et à l'amplification du processus inflammatoire pouvant ainsi mener au développement de pathologies telles que l'asthme, pancréatites, pneumonites, colites ulcéreuses et choc endotoxique (Peplow, 1999). Le PAF peut également avoir des répercussions sur la régulation de plusieurs systèmes vitaux (cardio-vasculaire, immun, reproductif, et système nerveux central) (Evangelou et al., 1994; Izumi et al., 1995). L'administration de faibles doses de ce puissant médiateur peut même produire les symptômes de bronchoconstrictions et de vasodilatation apparentés au choc anaphylactique (Imaizumi et

al., 1995). Les principales actions biologiques du PAF chez l'homme sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 1 : Actions biologiques du PAF sur les cellules et systèmes de l'homme.

Types cellulaires et systèmes	Réponses
Éosinophiles	Production de superoxyde Transmigration à travers les cellules épithéliales Translocation, dégranulation Relâchement d'IL-8
Neutrophiles	Production de superoxyde
Lymphocytes	Migration
BEAS-2B (Lignée de cellules épithéliales bronchiques)	Activation d'AP-1
Cellules épithéliales de la trachée	Hausse de la perméabilité aux éosinophiles
Endomètre	Production de NO
Fibroblastes pulmonaires	Expression de c-fos, c-jun, IL-6 et IL-8
Cellules de muscle lisse vasculaire	Expression de VEGF
Système vasculaire	Neutropénie
Cellules dendritiques	Migration
Système respiratoires	Dérangement des fonction pulmonaires

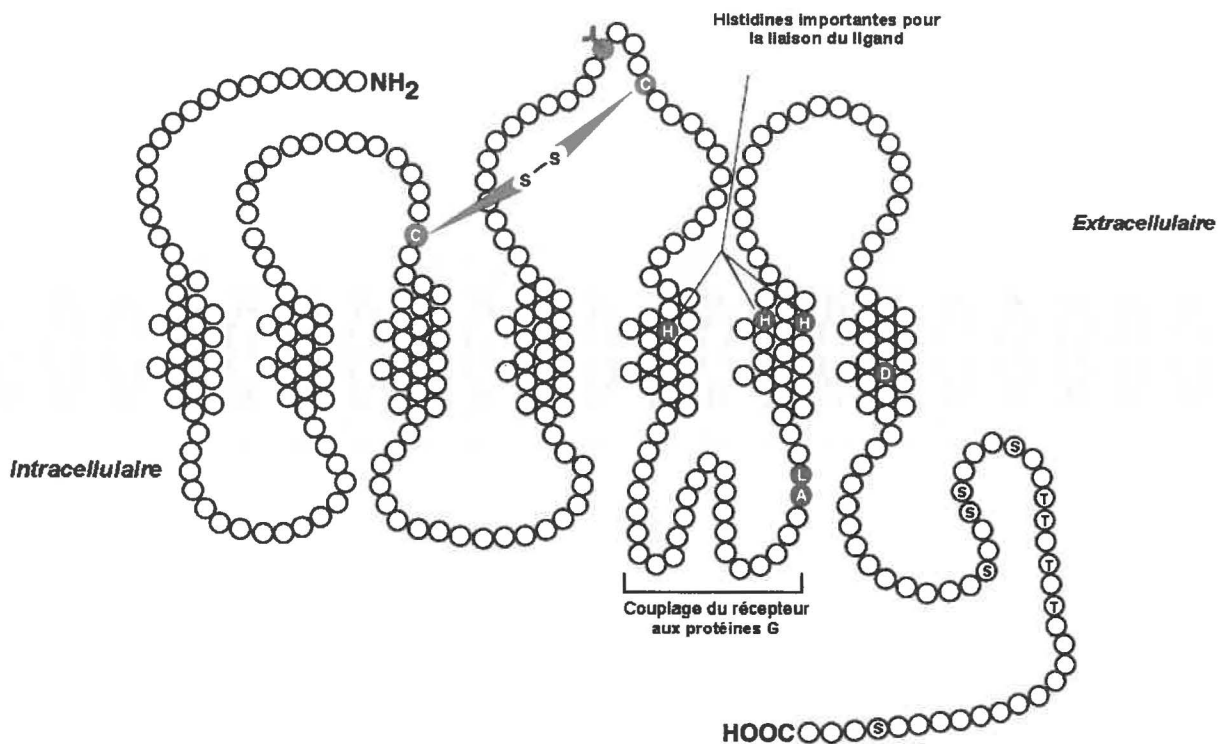
Adapté de Ishii et al., 2000.

LE RÉCEPTEUR DU PAF

La réponse biologique médiée par le PAF résulte de sa liaison à un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) exprimé à la surface cellulaire. Le gène du récepteur humain du PAF (hPAFR) code pour 342 acides aminés et la séquence présente une homologie de 80% avec celle du cobaye (Ye et al., 1991; Izumi et al., 1995; Shimizu et al., 1996). Des études de mutagenèse où une alanine et une leucine de la troisième boucle intracellulaire ont respectivement été substituées en glutamate (A230E) et en arginine (L231R) ont démontré le rôle de cette région dans le couplage et l'activation de protéines G du PAFR (Parent et al., 1996). Dans une autre étude, l'aspartate de la position 289 du septième domaine transmembranaire a été remplacé par une alanine. Cette mutation mène à une augmentation de l'affinité pour le PAF, l'absence de couplage et une incapacité à engendrer une réponse mesurée en accumulation d'inositols phosphate, ce qui suggère ainsi l'importance de ponts hydrogènes dans la conformation et la transition de la forme inactive du récepteur à la forme active, nécessaire à la transduction du signal (Parent et al., 1996b). L'importance de la région centrale du récepteur dans la liaison du ligand a aussi été démontrée suite à la mutation de trois histidines situées dans les domaines transmembranaires V et VI (Ishii et al., 1997).

Le PAFR peut également subir des modifications post-traductionnelles. Par exemple, on peut noter la présence d'un pont disulfure entre les cystéines des positions 90 et 173 qui semble être nécessaire au ciblage du récepteur à la membrane plasmique (Le Gouill et al., 1997). La glycosylation du récepteur à la deuxième boucle extracellulaire du PAFR est aussi requise pour l'expression membranaire du récepteur mais ne semble toutefois pas avoir un rôle dans l'affinité et l'activité du récepteur (Garcia Rodriguez et al., 1995). La présence de 9 sites

potentiels de phosphorylation à l'extrémité carboxy-terminale semble être impliquée dans la désensibilisation du récepteur (Takano et al., 1994; Ishii et al., 1999; Le Gouill et al., 1997b).



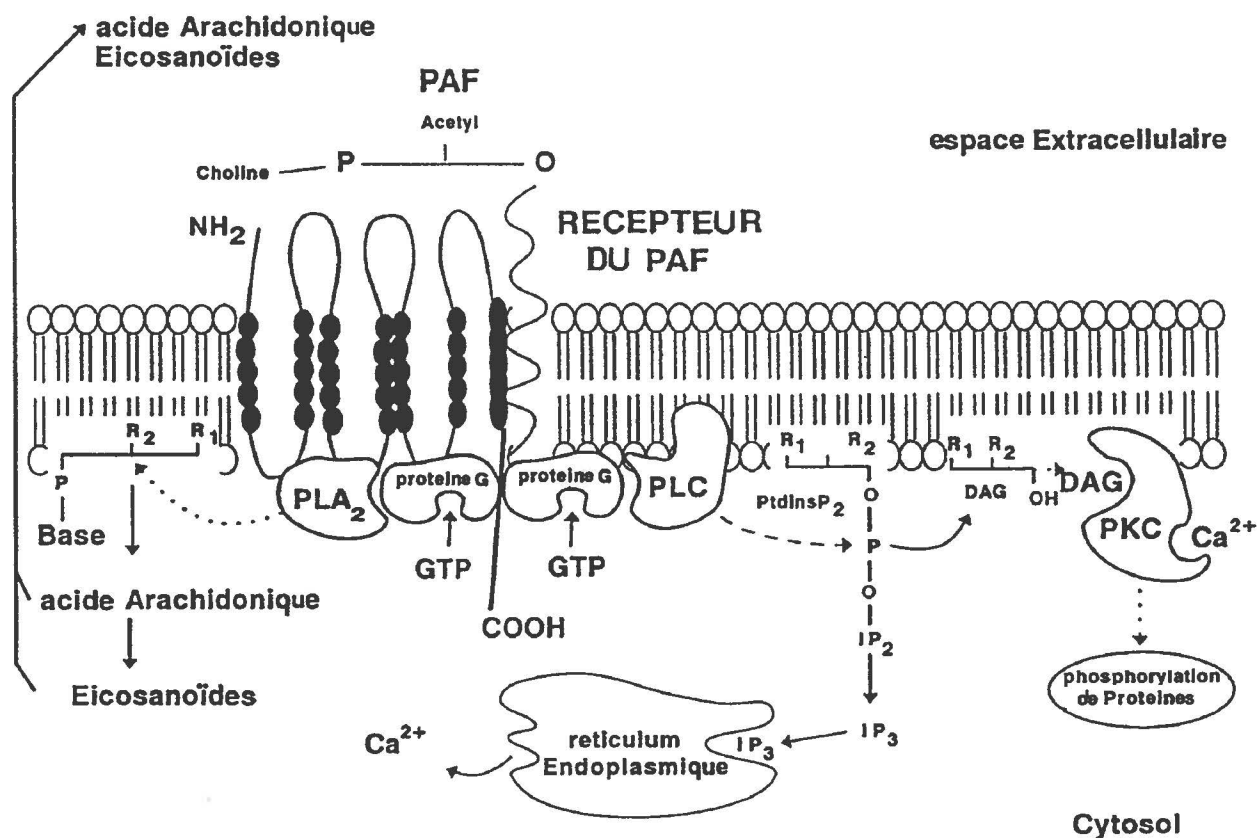
Modifié de Prescott et al., 2000.

Schéma 5 : Représentation du récepteur du PAF humain. Les cercles désignent les résidus d'acides aminés. La position relative des résidus substitués chez les récepteurs mutants mentionnés sont indiqués. Les sites potentiels de phosphorylation sérine/thréonine sont identifiés à la queue cytoplasmique. Le site de glycosylation du récepteur est représenté au résidu asparagine 169 et le pont disulfure reliant les cystéines de la première et deuxième boucle cellulaire est montré.

Signalisation

La liaison du PAF à son récepteur entraîne une cascade d'événements biochimiques menant à la transduction du signal et à l'activation de la cellule cible (Bito et al., 1997). Une des réponse les plus hâtives du PAF est l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Cet effet génère deux seconds messagers, l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) qui participeront par la suite à la redistribution de Ca²⁺ intracellulaire et à l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Ali et al., 1994; Shukla, 1991). De plus, le PAF peut causer l'activation de la phospholipase A₂ qui mène ainsi à la libération d'acide arachidonique et de métabolites apparentés à la prostaglandine (Okayasu et al., 1987; Kawaguchi et al., 1986). L'hydrolyse de la phosphatidylcholine par la phospholipase D (PLD) est, tant qu'à elle, responsable de la libération de l'acide phosphatidique conduisant à la production de DAG (Liu et al., 1997). Le PAF peut également activer les "mitogen-activated protein kinases" (MAPKs) via l'activation de la phosphatidyl-3-kinase (PI3K) et de tyrosine kinases chez les éosinophiles humains (Miike et al., 2000). Une récente étude a toutefois démontré que l'activation de la tyrosine kinase 2 (Tyk2) par le PAF pouvait se produire de façon indépendante des protéines G (Lukashova et al., 2001).

Le système de signalisation intracellulaire du PAF fait cependant face à une régulation étroite. Le PAF est tout d'abord contrôlé au niveau de sa voie de synthèse et de sa disponibilité biologique (Prescott et al., 2000). Les acétylhydrolases intracellulaires et extracellulaires contribuent ensuite à sa régulation par sa dégradation en ses dérivés inactifs, le lysoPAF et l'acétate (Stafforini et al., 1997). L'expression de son récepteur est également restreinte à certains types cellulaires, ce qui contribue à la spécificité de sa réponse (Prescott et al., 2000).



Modifié de Montrucchio et al., 2000.

Schéma 6 : Mécanismes généraux de transduction du signal du récepteur du PAF.

PLA₂, phospholipase A₂; PLC, phospholipase C; PtdInsP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; IP₂, inositol 4,5-bisphosphate; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; DAG, diacylglycérol; PKC, protéine kinase C.

Désensibilisation

Plusieurs groupes ont reporté que l'action du PAF peut être désensibilisée suite à une exposition répétée ou de longue durée à l'agoniste (Takano et al., 1994; Ishii et al., 1998; Kamata et al., 1996). L'implication de la PKC dans le contrôle homologue et hétérologue du PAF a été amplement étudiée. Il a ainsi été démontré que la perte de capacité de couplage induite par le PAF peut être bloquée par des inhibiteurs de PKC comme la staurosporine et le 1-5[5-isoquinolinesulfonyl] pipérazine (O'Flaherty et al., 1992). D'autres études ont montré que l'activation de la PKC indépendante du PAF, médiée par le 4 β PMA ou taléocidine, peut également induire une baisse du potentiel de réponse (Chao et al., 1993). L'inhibition de la PKC ne semble toutefois pas suffisante pour l'abolition de la phosphorylation du récepteur après une stimulation par l'agoniste (Ali et al., 1994), suggérant ainsi l'implication d'autres kinases dans le processus de désensibilisation du récepteur. Cette hypothèse est également basée sur l'induction de la translocation et l'activation d'une GRK cytoplasmique par le PAF dans les leucocytes humains et la phosphorylation d'un peptide synthétique de la queue cytoplasmique du PAFR par la GRK2 (Takano et al., 1994).

L'internalisation du PAFR se fait selon un processus dépendant de l'agoniste et de la température (Gerard et al., 1994). La PKC ne semble toutefois pas induire ou moduler l'internalisation du récepteur par les vésicules de clathrine (Le Gouill et al., 1997b). L'implication potentielle de l'activation de la PLC dans l'internalisation a été amenée suite à la découverte que le complexe AP-2 pouvait se lier au phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Beck et al., 1991) et à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (Volgmaier et al., 1992). Il a aussi été démontré par des traitements à la toxine pertussique que le couplage et l'activation des

protéines G était primordial à l'internalisation du récepteur de la somatostatine (Koenig et al., 1997). Cette observation est toutefois contraire à celle observée pour le PAFR où le couplage aux protéines G et la signalisation ne participent pas à l'internalisation du récepteur induite par le ligand (Le Gouill et al., 1997b). Il a également été noté que la phosphorylation de la queue C-terminale du hPAFR semble faciliter l'internalisation du récepteur sans toutefois être essentielle pour celle-ci (Ishii et al., 1997). D'autres données démontrent que l'internalisation du PAFR est accrue par la surexpression de β -arrestine 1, β -arrestine 2 et dynamine (Chen et al., manuscrit en préparation).

Possibilité d'oligomérisation

Il a précédemment été démontré que la coexpression de certains récepteurs mutants du hPAFR peut être utilisée pour modifier des caractéristiques spécifiques du récepteur de type sauvage comme le niveau d'activité basale, l'affinité pour le ligand ainsi que l'expression de surface (Le Gouill et al., 1999). Ces évidences ne prouvent cependant pas directement l'existence du récepteur sous la forme d'un ordre oligomérique.

PARTIE 4 : RÉTICULATION INDUITE PAR LA COUMERMYCINE

La DNA gyrase est une topoisomérase bactérienne de type II qui peut introduire des surenroulements négatifs dans l'ADN en utilisant l'énergie libre résultante de l'hydrolyse de l'ATP (Reece et al., 1991). La forme enzymatique provenant de *Escherichia coli* est constituée de deux protéines, A et B, d'un poids moléculaire respectif de 97 et 90 KDa et la forme active de l'enzyme est formée par un complexe tétramérique A_2B_2 . Les sous-unités A et B contiennent différents domaines fonctionnels. La protéine A est principalement impliquée dans le bris de l'ADN (Reece et al., 1989), tandis que la sous-unité B est plutôt responsable de l'activité nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP (Gellert et al., 1979). Les coumarins sont des puissants inhibiteurs de la réplication de l'ADN bactérien (Maxwell et al., 1992). La liaison des coumarins à la portion N-terminale de la sous-unité B de la gyrase bloque la liaison de l'ATP de façon non-compétitive, empêchant alors la réaction ATPasique nécessaire à l'activité de la gyrase (Gilbert et al., 1994; Maxwell et al., 1993; Ali et al., 1993). Une molécule de coumermycine se lie ainsi à deux sous-unités B de la gyrase (1 : 2) tandis qu'un autre antibiotique coumarin apparenté, la novobiocine, se lie plutôt selon une stoechiométrie de 1 : 1.

Farrar et collaborateurs ont démontré que la dimérisation était suffisante à l'activation de la cascade des MAP kinases par la protéine kinase Raf-1, et ce, indépendamment de sa translocation à la membrane cellulaire. Cette observation a été obtenue à l'aide d'une méthode de dimérisation chimique induite par la coumermycine où cet agent perméable à la cellule a permis le contrôle spécifique de l'oligomérisation intracellulaire de la protéine Raf-1 (Farrar et al., 1996). Cette réticulation a été rendue possible en fusionnant le sous domaine de la protéine B de la gyrase à la protéine Raf. Un dimère de Raf était donc formé suite au traitement à la

coumermycine, tandis qu'un coumarin apparenté mais monovalent, la novobiocine, n'induisait pas la dimérisation de la protéine. La coumermycine a l'avantage d'être perméable à la cellule et commercialement disponible, contrairement à l'agent dimérisant FK1012 (Spencer et al., 1993). Son effet sur les cellules et animaux a également été l'objet d'une étude méticuleuse (Godfrey et al., 1972). Le système expérimental est résumé sur le schéma suivant.

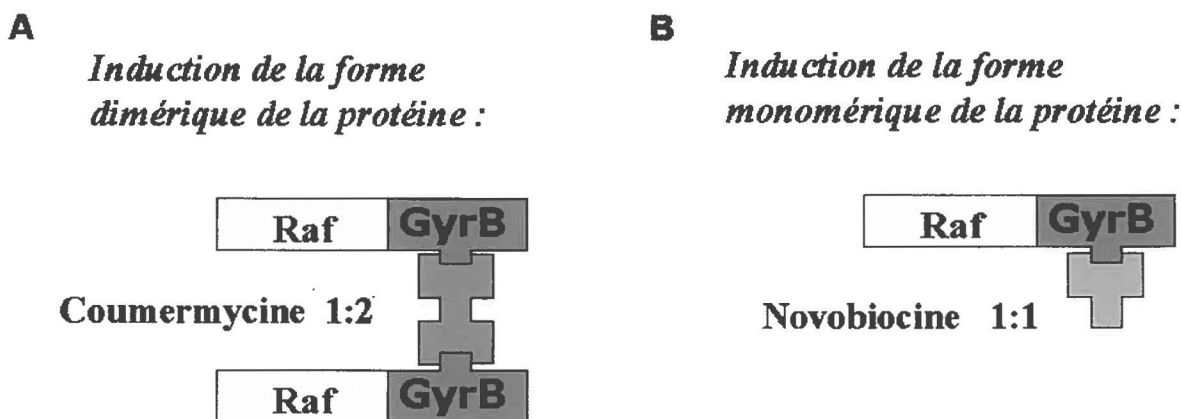


Schéma 7 : Système de réticulation chimique de Raf induite par la coumermycine.

L'addition de coumermycine devrait mener à la formation d'un homodimère Raf-GyrB : Raf-GyrB (A), tandis que l'ajout de novobiocine devrait plutôt favoriser la forme monomérique de la protéine Raf (B).

Cette stratégie de dimérisation a ensuite été utilisée dans différents systèmes comme dans le cas des cellules lymphoblastoïdes où on a démontré que la dimérisation de la L-sélectine pouvait augmenter à elle seule l'extravasation des lymphocytes et l'affinité pour le ligand (Li et al. 1998). D'autres études ont rapporté que la dimérisation de la Janus Kinase 2 (JAK2) pouvait induire son activation indépendamment du récepteur (Mohi et al. 1998) et que la dimérisation de Stat-3 induite par la coumermycine entraînait des effets similaires à l'IL-10 (O'Farrel et al., 1998).

B. Prologue :

OBJECTIFS DE RECHERCHE ET STRATÉGIES UTILISÉES

Étant donné que la dimérisation semble avoir une implication au niveau de l'activité d'un nombre grandissant de GPCRs, nous avons tenté de démontrer directement la présence de dimères du hPAFR à l'aide d'études de coimmunoprécipitation différentielle. Ce type d'étude s'est également avéré utile dans la recherche de partenaires d'hétérodimérisation potentiels du hPAFR. Le type d'interaction responsable de l'ordre dimérique du récepteur a ensuite été étudié à l'aide d'agents réducteurs et d'un mutant de délétion du récepteur auquel une partie de la queue C-terminale a été enlevée.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier l'implication de la dimérisation du hPAFR dans le processus d'internalisation des récepteurs. Nous avons alors utilisé le système de dimérisation induite par la coumermycine pour la réticulation du récepteur. L'internalisation du récepteur résultant, le hPAFR-GyrB, a ensuite été mesurée à l'aide de trois techniques différentes, ce qui a rendu possible l'analyse de la répartition des récepteurs tant au niveau de la membrane plasmique que sur le plan intracellulaire. Les études de liaison ont tout d'abord permis la mesure de la perte de sites de liaison du récepteur pour un antagoniste radiomarqué imperméable à la cellule, traduisant ainsi la désensibilisation du récepteur sous un aspect général. Les études d'incorporation ont, tant qu'à elles, été effectuées à l'aide d'un ligand radiomarqué perméable à la cellule qui a rendu possible l'évaluation d'une résultante de l'internalisation, soit la quantité de complexes ligand-récepteur présents à l'intérieur de la cellule. La cytofluorométrie a finalement permis la mesure de l'internalisation des récepteurs en tenant compte de leur disparition de la membrane plasmique.

Tableau 2 : Méthodes utilisées pour mesurer l'internalisation du hPAFR-GyrB.

Technique	Marqueur	Région	Détection
Études de liaison	[³ H]WEB2086	Surface	Perte de liaison de récepteurs (Désensibilisation/Internalisation)
Incorporation du ligand	[³ H]PAF	Intracellulaire	Complexes ligand-récepteur internalisés
Cytofluorométrie	anti-c-myc	Surface	Disparition des récepteurs

Les mécanismes responsables de l'internalisation du hPAFR-GyrB ont ensuite été analysés par microscopie confocale où la translocation des β -arrestines a été étudiée. La relation entre l'activation de la PLC et l'internalisation du récepteur a été évaluée par des essais d'accumulation d'inositols phosphate et des inhibiteurs de protéines kinases ont été utilisés afin de cibler le rôle potentiel de celles-ci dans l'internalisation/désensibilisation du hPAFR-GyrB.

C. Article

Agonist-independent desensitization and internalization of the human platelet-activating factor receptor by coumermycin-gyrase B-induced dimerization.

Amélie Perron, Zhang-guo Chen, Denis Gingras, Denis J. Dupré, Jana Stankova
and Marek Rola-Pleszczyński

*Immunology Division, Department of Pediatrics,
Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, QC Canada J1H 5N4*

ABSTRACT :

Platelet-activating factor (PAF) is a phospholipid with potent and diverse physiological actions, particularly as a mediator of inflammation. We have previously reported that mutant G-protein-coupled receptors (GPCRs) can affect the functional properties of co-expressed wild-type human PAF receptor (hPAFR). Increasing evidence suggests that dimerization of GPCRs may play an important role in the regulation of their biological activity. However, its involvement in receptor internalization is not well understood. To investigate the specific role of dimerization in the internalization process of GPCRs, we generated a hPAFR-GyrB fusion protein, dimerized through the addition of coumermycin. We found that dimerization was by itself sufficient, in the absence of agonist, to induce internalization of hPAFR-GyrB, which occurred without the activation of phospholipase C (PLC) in CHO cells. Moreover, stimulation by coumermycin led to a time-dependent disappearance of [3 H]-WEB2086 (antagonist) binding sites. Confocal microscopy experiments with COS-7 cells showed that coumermycin-induced sequestration of hPAFR-GyrB was independent of arrestin translocation. Finally, the protein kinase C (PKC) inhibitors staurosporine and GF109203X blocked the coumermycin-induced desensitization of hPAFR-GyrB, suggesting the implication of PKC in the molecular mechanism mediating the agonist-independent internalization of the receptor. Taken together, these findings suggest a novel mechanism of GPCR desensitization and internalization triggered by induced dimerization.

INTRODUCTION :

Platelet-activating factor (PAF) is a phospholipid with potent chemoattractant and leukocyte activation properties (1, 2). PAF is thought to be a mediator of cell-to-cell communication, which may function either as an intercellular or an intracellular messenger (3). Its presence has been associated with a number of inflammatory and allergic responses which can result in pathologic events that affect the cardiovascular, cerebral, respiratory, gastrointestinal, dermal, reproductive, renal, hepatic and pancreatic systems, as well as transplanted tissues (4, 5). The biologic activity of PAF is mediated by its interaction with a unique G-protein-coupled receptor (GPCR), the PAF receptor (PAFR) (6).

Upon binding to its receptor, PAF activates multiple intracellular signal transduction pathways which include turnover of phosphatidylinositol, elevation in intracellular calcium concentration, and activation of kinases, resulting in multiple and diverse bioactions (7, 8). Exposure of GPCRs to their agonists is usually followed by a rapid desensitization of signaling (9-11). A series of distinct events are known to participate in this mechanism, including a functional uncoupling of the receptor from the G-protein, a net loss of receptors (receptor down-regulation) and sequestration of the receptors into intracellular compartments. GPCR internalization has become the subject of an intensive investigation over the past several years and a large volume of data has accumulated regarding the mechanisms regulating the endocytosis of a wide variety of different GPCRs. The β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) and a large number of GPCRs have been demonstrated to internalize through a dynamin-dependent mechanism involving clathrin-coated pits (12,13). However, other pathways also participate in the endocytosis of GPCRs. Some receptors such as the dopamine D₂ receptor (14), the type 1 angiotensin receptor (AT_{1A}R), and the m2 muscarinic receptor can internalize by an

unidentified mechanism that shows an atypical sensitivity to dynamin (15-17). In addition, further analysis revealed that the N-Formyl peptide and C5a chemoattractant receptors are internalized via an arrestin- and dynamin-independent pathway (18) which leads to questions about an alternative mechanism involved in mediating desensitization and internalization of these receptors.

It has been shown that the human (h)PAFR undergoes a ligand-specific, temperature-dependent internalization in transfected cells (19). Moreover, we have reported that G-protein coupling and signaling are not implicated in hPAFR internalization (20). In the latter study, we demonstrated that PKC does not trigger or modulate the internalization process and suggested the participation of clathrin-coated vesicles in hPAFR internalization. Other data strongly suggest that hPAFR internalization is arrestin- and dynamin-dependent and is increased by overexpression of arrestin 2 and arrestin 3 (Chen et al., manuscript in preparation).

An increasing number of studies have shown that many GPCRs can form dimers. For example, homodimerization has been demonstrated for the β_2 AR (21), the δ -opioid receptor (22), the chemokine receptors CCR2b, CCR4 and CCR5 (23, 24), the dopamine D₁, D₂ and D₃ receptors (25-27), the muscarinic m2 and m3 receptors (28, 29), the Ca²⁺ sensing receptor (30), the AT_{1A}R (31), and the metabotropic glutamate receptor 5 (32). Agonists have also been shown to stabilize the dimeric form of several receptors including the β_2 AR (21), and the chemokine receptors CCR2b, CCR4, and CCR5 (23, 24). This suggests that homodimerization could play a role either directly in the activation mechanism of receptors or, alternatively, in subsequent agonist-dependent desensitization and internalization (33) as shown for the δ -

opioid receptor (22). In the latter study, the authors demonstrated that a mutant receptor with a deletion of the 15 C-terminal residues that did not dimerize could no longer be internalized. Hence, they suggested that internalization could be regulated by signals determined by secondary structure/conformation of the receptor that would be involved in the interconversion between the dimeric and monomeric form.

We have previously demonstrated that co-expression of certain mutant hPAFR receptors with wild-type hPAFR could also be used to modify specific characteristics of the wild-type receptor, such as basal level of activity, affinity for the ligand and the extent of cell surface expression (34). However, although these findings are consistent with a capacity of hPAFR to form oligomers, they do not provide direct physical evidence that such receptor species actually exist.

To determine whether artificially-induced oligomerization of hPAFR could initiate or potentiate the internalization process of the receptor, we applied the coumermycin-induced dimerization system (35) which is based on the binding of coumermycin to the amino-terminal 24 kDa subdomain of the B subunit of bacterial DNA gyrase (GyrB) (36). Coumermycin acts as a natural dimerizer of GyrB, because it binds GyrB with a stoichiometry of 1:2, whereas a related coumarin antibiotic, novobiocin, binds GyrB as a 1:1 complex (37) and thus serves as a non-dimerizing control. A hPAFR-GyrB fusion protein was generated, with the GyrB moiety fused to the C-terminal tail of hPAFR, that could be induced to dimerize by coumermycin. We report here that hPAFR-GyrB is desensitized and internalized in the presence of coumermycin, in an agonist- and arrestin-independent manner and that this internalization involves protein kinase C (PKC) but not tyrosine kinase or phospholipase C (PLC) activity.

MATERIAL AND METHODS :

Chemical Reagents - Oligonucleotides, cell culture media and LipofectAMINE were purchased from Life Technologies, Inc. Restriction endonucleases and T4 DNA ligase were from Promega and Amersham Pharmacia Biotech. The human PAFR cDNA was a generous gift from Dr. R. Ye (University of Chicago, Chicago, IL) and pcDNA3-Raf-GyrB was kindly provided by Dr. Michael A. Farrar (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ). Bovine serum albumin, Tyrostatin 51, paraformaldehyde, coumermycin and novobiocin were from Sigma. Staurosporine and GF109203X were from BIOMOL Research Laboratories. NH_4Cl and DMSO from Fisher and lipid-free bovine serum albumin was from Calbiochem. AG1-X8 resin was from Bio-Rad and DEAE-Dextran was purchased from Pharmacia. PAF was from the Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI), $[\text{}^3\text{H}]$ hexadecyl-PAF and *myo*- $[\text{}^3\text{H}]$ inositol were from Amersham Corp. WEB 2086 and FuGENETM 6 were from Roche Molecular Biochemicals. $[\text{}^3\text{H}]$ WEB2086 was purchased from NEN Life Science Products. Antibodies used were rabbit polyclonal anti-c-*myc* (A-14) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), monoclonal anti-c-*myc* (9E10) (ATCC, Manassas, VA) and monoclonal anti-HA (12CA5) (BAbCO, Richmond, CA). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and donkey anti-rabbit antibodies were from Amersham Pharmacia Biotech. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse and rhodamine-conjugated goat anti-mouse Abs were obtained from Bio/Can Scientific (Mississauga, ON, Canada).

Construction of Epitope-tagged PAFR-GyrB – Human PAF receptor was epitope-tagged in the amino-terminal extracellular domain with either a c-*myc* or a hemagglutinin (HA) epitope, as described previously (20) and subcloned into the pcDNA3 vector. To construct PAFR-GyrB,

NheI, NotI and ApaI sites were introduced in the pcDNA3-c-myc-hPAFR by digestion using the oligonucleotides 5'-CTGGCAATTCCTCAAAAATGCTAGCTAGGCGGCCGCGGGC-3' corresponding to the last 23 nucleic acids of the hPAFR. The stop codon was then replaced at the NheI-NotI sites with the coding region of GyrB isolated from pcDNA3-Raf-GyrB at XbaI and NotI sites. Constructs were verified by restriction enzyme digestion.

Cell Culture and Transfections - COS-7 and CHO cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (high glucose) and DMEM F-12 (Ham's medium, high glucose), respectively, supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). Cells were grown in 100-mm dishes to 70-80% confluence and transiently transfected the following day with 7 ml of a mixture of 100 µM chloroquine and DEAE-dextran (0.25 mg/ml) containing 4 µg of plasmid DNA (pcDNA3-c-myc-hPAFR, pcDNA3-HA-hPAFR, or pcDNA3-c-myc-hPAFRGyrB) in DMEM with 5% FBS. After 2 h at 37°C, the solution was removed and the cells were treated for 1 min at room temperature with 10% dimethyl sulfoxide in phosphate-buffered saline (PBS), rinsed twice with PBS, and returned at 37°C incubator in growth medium supplemented with 5% FBS. For confocal microscopy experiments, cells were seeded into 6-well plates (1-1.5 X 10⁵ cells/ml) and transiently transfected with 1 µg of plasmid DNA/well by using the FuGENE 6 transfection reagent (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer's instructions. Stable CHO transfectants expressing the pcDNA3-c-myc-hPAFR were generated as described previously (38). CHO stably transfected with the pcDNA3-c-myc-hPAFR-GyrB were established as above except that positive cells were selected with a FACS-Vantage cell sorter (BD Biosciences) following labeling with anti-c-myc mAb and FITC-conjugated goat anti-mouse Ab.

Immunoprecipitation and Western Blotting – COS-7 were rinsed 48 h after transfection with PBS. Cells were then removed from 100-mm plates and collected by centrifugation in PBS. The cell pellet from each plate was disrupted in 500 μ l of RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1%, IGEPAL, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (1 μ g/ml soybean trypsin inhibitors, 1 μ M leupeptin, 20 μ g/ml aprotinin, 40 μ g/ml prefabloc, and 40 μ g/ml TLCK) and incubated 30 min on ice. Lysates were then precleared with 25 μ g of protein A-Sepharose for 30 min at 4°C and incubated with anti-c-myc or anti-HA Abs for 1 h at 4°C. The protein A-Sepharose was gently shaken in lysis buffer containing 1% BSA for 30 min at room temperature before use. Epitope-tagged hPAFR were precipitated by incubation with 100 μ g of protein A-Sepharose for 2 h at 4°C. After washing 3 times in lysis buffer, complexes were dissolved in 1 X loading buffer, separated by 10% SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in PBS-Tween 0.1% containing 10% dried milk for 1 h and incubated with anti-HA or anti-c-myc in PBS 1% dried milk 1h at room temperature. After washing with PBS-Tween and incubation with secondary antibodies, an enhanced chemiluminescent detection system was used for protein detection (Amersham Pharmacia Biotech).

Flow Cytometry Studies – Receptor internalization was determined as the level of receptor loss from the cell surface. Stably transfected CHO cells were seeded on 6-well plates (4×10^5 cells/well) one day prior the assay. Cells were then washed with PBS and incubated in DMEM F12 with the indicated concentration of coumarins for a specific time period. Cells were rinsed once with PBS and treated with PAF (10^{-6} M) for the appropriate time in media containing 0.2% BSA. Cells were then washed once with PBS containing 2% BSA to remove the agonist (PAF) and harvested in ice-cold PBS. Cells were first labeled with or without anti-c-myc

antibody on ice for 1 hour. After washing twice with ice-cold PBS, cells were incubated for an additional 45 min with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse Ab on ice and washed as described above. Antibody-stained cells were analyzed for fluorescent intensity on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) with dead cells excluded by a gate on forward and side scatter.

Radioligand Binding Assay - Competition binding curves were done on CHO cells expressing the wild-type or Gyr-B receptor species and binding reactions with 10 nM ^3H -WEB2086 were done as described before (20). Internalization experiments were done on stably transfected CHO cells seeded onto 100-mm dishes 24 h prior to assay. Cells were washed once with PBS and pretreated or not with the indicated inhibitors (NH_4Cl (10 mM, 10 min), staurosporine (3 μM , 20 min), GF109203X (2 μM , 30 min), Tyrphostin 51 (10 μM , 25 min) or novobiocin (1 mM, 500 μM , and 150 μM , 20min)) at 37°C in DMEM F12. Cells were then washed with PBS and incubated at 37°C with coumarins or PAF (10^{-6}M) in media containing 0.2% BSA for the indicated time. Binding reactions were done on ice as described above.

Ligand Internalization – The ligand internalization kinetics had been evaluated in CHO cells stably transfected with the hPAFR or hPAFR-GyrB in 12-well plates (2×10^5 cells/well). After 24 h, cells were pretreated or not with coumermycin (15 μM for 10, 45, 80, 120, 180, and 210 min). Cells were then incubated at 37°C with 2 nM [^3H]hexadecyl-PAF in a buffer containing 150 mM choline chloride, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , and 0.2% lipid-free BSA (19) for 45 minutes. After the incubation period, cells were washed twice with 1 ml of the same buffer but containing 2% BSA. Cells were then lysed in 0.1 N NaOH and internalized radioactivity was measured by liquid scintillation.

Inositol Phosphate Determination – Stably CHO transfected cells were plated on 6-well dishes (4.0×10^5 cells/well) and incubated at 37°C in complete media 12 h before the assay. Cells were then washed once in PBS and labeled for 18-24 h with *myo*-[^3H]inositol at 3 $\mu\text{Ci/ml}$ in DMEM (high glucose, without inositol). After labeling, cells were washed once in PBS and preincubated at 37°C in pre-warmed modified media containing 20 mM LiCl for 10 min. Media was then removed and cells were pretreated, or not, with coumermycin (15 μM) or novobiocin (15 μM) for the indicated period of time in modified media containing 20 mM LiCl. Cells were washed with PBS and incubated in pre-warmed media containing 0.2% BSA and 20 mM LiCl for 10 min with PAF (10^{-6}M). The reactions were terminated with the addition of perchloric acid followed by a 30-min incubation on ice. Inositol phosphates (IP) were extracted as described previously (34) and separated on Dowex AG1-X8 columns. Total labeled inositol phosphates were then counted by liquid scintillation.

Confocal Microscopy - COS-7 cells were grown on 25 mm coverslips and transiently transfected with pcDNA3-c-myc-hPAFRGyrB and arr2-GFP or arr3-GFP (kind gifts from Dr. J. Benovic, Philadelphia PA) using FuGENETM6 and processed as previously described (34). Cells were incubated in the presence or absence of coumermycin or novobiocin (15 μM , 180 min) and then, treated or not with PAF (1 μM) for 80 min. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (15 min at RT) and permeabilized in 0.1% saponin. Cells were then incubated with anti-c-myc Ab followed by rhodamine-conjugated goat anti-mouse Ab. Cells were examined with a scanning confocal microscope (NORAN Instruments Inc., Middleton, WI) equipped with a krypton/argon laser and coupled to an inverted microscope with a 40x oil immersion objective (Nikon). Optical sections were collected at 1- μm intervals with a 10- μm

pinhole aperture. Digitized images were obtained with 256 times line averaging and enhanced with Intervision software (NORAN Instruments Inc.) on a Silicon Graphics O2-work station.

RESULTS :

Dimerization of hPAFR - To study whether hPAFR can form dimers, albeit under conditions of overexpression, we used COS-7 cells transiently expressing c-myc epitope-tagged hPAFR. Immunoblotting (IB) of c-myc epitope-tagged receptor with rabbit anti-c-myc antibody consistently revealed the presence of molecular species corresponding to the expected positions of the monomeric receptor (38-45 KDa) as well as higher molecular weight forms corresponding to twice that of the monomer (80-85 KDa), suggesting the existence of an SDS-resistant dimeric species of hPAFR (fig. 1A, lane 2). Higher molecular mass forms of hPAFR were also detected, suggesting the possibility of higher order structures, such as receptors tetramers. The identity of the dimer was confirmed by immunoprecipitation (IPP) experiments using differentially tagged receptors. In cells co-expressing both HA- and c-myc-tagged hPAFR, blotting of the anti-c-myc immunoprecipitate with the anti-HA Ab revealed the presence of hPAFR, indicating that dimerization occurred between the two different epitope-tagged receptors (fig.1B, lane 1). The specificity of the Abs is illustrated by absence of cross-reactivity in cells expressing only one tagged receptor species (figure 1B, line 2).

Characterization of the hPAFR-GyrB - In order to study the effect of artificially induced dimerization of hPAFR on cells, we constructed a chimeric cDNA encoding hPAFR and GyrB as a fusion protein (hPAFR-GyrB) and generated a stable hPAFR-GyrB-expressing CHO cell line. We next determined the effect of fusing GyrB to the intracellular C terminus of the hPAFR on receptor properties by comparing CHO cells stably expressing the wild-type hPAFR with CHO cells stably transfected with hPAFR-GyrB. Flow cytometry studies showed that wild-type hPAFR and hPAFR-GyrB had similar cell surface expression levels (Fig. 2A and B),

indicating that GyrB had no significant effect on cellular trafficking and distribution of the receptor. Binding characteristics were determined using the PAF receptor antagonist, [^3H]WEB2086, by competition with WEB2086. Competition binding experiments showed that the affinity of WEB2086 for hPAFR-GyrB was unaltered compared to the wild-type receptor, as shown in Fig 2C. In order to investigate the signaling capacity of the mutant receptor, we examined the ability of hPAFR-GyrB to mediate the stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis. Agonist-independent basal IP production and agonist-induced increased IP production were similar in both hPAFR- and hPAFR-GyrB-transfected cells, as shown in Fig. 2D. Thus, the addition of the GyrB moiety did not lead to detectable changes in hPAFR function.

Agonist-independent desensitization of the hPAFRGyrB - Dimerization-induced PAFR desensitization was analyzed in CHO cells stably expressing the hPAFR or hPAFR-GyrB receptors, using three different approaches : (1) loss of ligand ([^3H]WEB2086) binding, (2) ligand ([^3H]PAF) internalization, and (3) loss of cell surface hPAFR expression. Cells were treated with coumarins (coumermycin or novobiocin) for the indicated times and the number of ligand-binding sites on the cell surface was measured using a saturating concentration of the hydrophilic ligand [^3H]WEB2086. Surprisingly, exposure to coumermycin alone initiated a time-dependent loss of receptor binding sites which reached $37 \pm 2\%$ of controls (Fig. 3A). The phenomenon occurred within 5 min after stimulation and reached a plateau after 1 h. Novobiocin, the monomeric coumermycin analogue, had no significant effect on receptor binding loss. Furthermore, pretreatment of CHO cells with novobiocin partially prevented the coumermycin-induced effect (Fig. 3B). These results suggested that, by inducing dimerization of hPAFR-GyrB, coumermycin could specifically induce a PAF-independent loss of binding

sites, which could be associated with receptor desensitization and/or sequestration. We next evaluated the time course of desensitization of hPAFR-GyrB in the presence of the agonist. Cells were pretreated for 40 min with coumermycin and 1 μ M PAF was added for the indicated time. As shown in Fig. 3C, loss of binding sites occurred with a half-time of approximately 5 min following the addition of agonist. The coumermycin-induced loss of [3 H]WEB2086 binding sites, which was independent of the agonist, did not prevent the further loss of binding sites induced by PAF, the two effects being additive.

Coumermycin-mediated sequestration of the hPAFR-GyrB in CHO cells - The results presented above strongly suggested that coumermycin played a role in the loss of [3 H]WEB2086 binding to hPAFR-GyrB in a ligand-independent manner. We therefore set out to analyze whether this phenomenon could be linked to receptor internalization. hPAFR-GyrB sequestration was analyzed in stably transfected CHO cells. The cells were exposed to coumermycin, for the times shown, at 37°C, prior to the addition of 2nM [3 H]PAF. Following continued incubation at 37°C for 40 min, cells were washed with BSA 2% to remove surface-bound ligand and lysed to allow the detection of internalized ligand. As shown in Fig. 4, coumermycin induced a time-dependent decrease in [3 H]PAF uptake with a nadir of $61.2 \pm 1.0\%$ of the values obtained for control untreated cells, at 180 min of treatment. This was possibly a reflection of our findings (Fig. 3A) that coumermycin could induce a loss of ligand binding sites in hPAFR-GyrB-expressing cells.

Ligand-independent internalization of hPAFR-GyrB mediated by coumermycin-induced dimerization - Internalization of receptors in response to coumermycin was also assayed by flow cytometry, by determining the level of depletion of surface epitope-tagged receptors.

Quantifying cell surface epitopes has been used with other receptors and represents a non-radioactive method of monitoring receptor sequestration (15, 42-44). Sequestration was defined as the fraction of total cell surface receptors that, after exposure to agonist, were removed from the plasma membrane and thus not accessible to antibodies from outside the cell. As shown in Fig. 5A, a significant decrease of approximately 30% in the level of cell surface expression of hPAFR-GyrB was observed when cells were subjected to coumermycin alone in the absence of agonist (Fig 5A). Since novobiocin or DMSO did not induce any change in the cell surface expression of receptors (data not shown), the disappearance of cell surface hPAFR-GyrB induced by coumermycin could reflect the role played by dimerization in controlling the internalization process. We next evaluated the time course of the agonist-mediated sequestration of receptors after a pretreatment with or without coumarins. CHO cells stably expressing the c-myc-tagged hPAFR or hPAFR-GyrB receptors were thus pretreated with coumarins (coumermycin or novobiocin) for 100 min at 37°C and exposed to PAF for 0-80 min. Following a 80-min stimulation with PAF, cell surface expression of wild-type receptor sequestered to a maximum of $24,3 \pm 0,4\%$ (Fig. 5B), compared to $13,5 \pm 1,9\%$ observed for hPAFR-GyrB (Fig 5C). This difference in the kinetics of receptor sequestration may be due to steric hindrance resulting from the GyrB fused to the C-terminal tail of the receptor, which could limit the accessibility of phosphorylation sites involved in the desensitization process. However, coumermycin pretreatment resulted in a specific 3-fold increase of internalized hPAFR-GyrB which has not been observed for wild-type receptor, suggesting that coumermycin may have stimulated the rate and extent of agonist-mediated internalization. As reported in Fig. 5A, the coumermycin-mediated internalization seems, nevertheless, to be a very slow process that required more than 100 min, compared to the

agonist-mediated sequestration which could be observed at 20 minutes (Fig. 5C). This effect could indicate that coumermycin may induce a compensatory upregulation of an alternate endocytic mechanism(s) in addition to the typical agonist-induced endocytosis. We next evaluated the concentration-response characteristics of the coumermycin-mediated internalization of hPAFR-GyrB followed by treatment with agonist. CHO cells were pretreated with coumermycin for the times shown and exposed to PAF for 80 minutes. As shown in 5D, the loss of surface-bound receptors, corresponding to the sequestration process, is potentiated by coumermycin in a concentration-dependent manner by as much as $35,4 \pm 0,2\%$ compared to the $19,7 \pm 2,6\%$ obtained with agonist only. Thus, the pretreatment with coumermycin facilitated the agonist-induced sequestration of hPAFRGyrB by inducing an additional agonist-independent process.

Mechanisms of hPAFR-GyrB internalization - It is well established that non-visual arrestins bind to agonist-activated GPCRs and serve as adaptator proteins during internalization of GPCRs through clathrin-coated pits. Arrestin (arr)2-GFP has been demonstrated to redistribute from the cytosol to the plasma membrane upon receptor stimulation (45) and colocalize with selective internalized GPCRs (46, 47). To evaluate the arrestin dependence of the coumermycin-mediated sequestration pathway, hPAFR-GyrB was cotransfected with the arr2-GFP or arr3-GFP fusion protein in COS-7 cells and subcellular distribution was analyzed by confocal microscopy. In unstimulated cells, hPAFR-GyrB was found predominantly on the cellular membrane and arr2-GFP was evenly distributed throughout the cytoplasm (data not shown). Following a 80-min stimulation with PAF, a punctate pattern of arrestin fluorescence (*green*) at the plasma membrane was observed, in proximity to the receptor (*red*). Extensive colocalization (*yellow*) of hPAFR-GyrB and arr2-GFP fluorescence was also observed in

endocytic vesicles (Fig. 6A). In contrast, arr2-GFP fluorescence did not colocalize with hPAFR-GyrB immunofluorescence emanating from endocytic vesicles which were observed following the coumermycin treatment (Fig. 6B). Arrestins remained exclusively in the cytoplasm, suggesting an arrestin-independent internalization pathway. Novobiocin also failed to induce any change in the cellular distribution of hPAFR-GyrB and arr2-GFP, which remained on the cell surface and cytoplasm, respectively (data not shown). We next evaluated the internalization behaviour of the receptor under PAF stimulation following coumermycin treatment. Interestingly, arr2-GFP redistributed from a homogeneous cytosolic localization to a membrane-associated pattern with appearance of arr2-GFP in endocytic vesicles randomly distributed throughout the cytoplasm (Fig. 6C). The overall distribution pattern of arr2-GFP appeared similar to the agonist-mediated internalization of hPAFR-GyrB observed above. Similar results were found using arr3-GFP (data not illustrated). The coumermycin-induced internalization was also independent of clathrin-coated pits because we failed to observe any change in the desensitization/internalization process after a NH_4Cl pretreatment compared to cells treated with coumermycin alone (data not shown).

Functional characterization of the coumermycin-induced internalization of hPAFR-GyrB in CHO cells - To determine whether the coumermycin-mediated internalization of hPAFR-GyrB was associated with receptor signalization, PLC activation was assessed in intact, stably transfected CHO cells by measuring IP accumulation. As shown in Fig. 7, no IPs were produced by hPAFR-GyrB over the entire duration of stimulation with coumermycin. In contrast, a 40-min PAF treatment of the cells resulted in a significant IP accumulation, showing that the preincubation time period with coumarins did not impair the functional

response of the receptor to its ligand. However, these data suggested that PLC activation does not participate in the coumermycin-induced internalization of hPAFR-GyrB.

Effect of Protein kinase Inhibitors on the Coumermycin-Induced Desensitization of hPAFR-GyrB - We have previously shown that inhibition or activation of PKC did not significantly affect the agonist-stimulated sequestration process for wild-type hPAFR (20) which was dependent on arrestins, dynamin and clathrin. Heterologous GPCRs desensitization can, however, be mediated by PKC (9). To further investigate the molecular mechanism mediating the coumermycin-induced ligand-independent desensitization of hPAFR-GyrB, we determined whether the effect of coumermycin occurred through activation of PKC. We preincubated CHO cells stably expressing hPAFR-GyrB in the presence or absence of the PKC inhibitors staurosporine and GF109203X prior to a 40-min incubation with coumermycin at 37°C (Fig. 8). Under these conditions, staurosporine and GF109203X inhibited the coumermycin-induced loss of [³H]WEB2086 binding sites by 75% and 50%, respectively. The tyrosine kinase inhibitor tyrphostin 51 had no significant effect on desensitization of hPAFR-GyrB. These data indicate that PKC is required for the coumermycin-mediated desensitization of hPAFR-GyrB, whereas tyrosine kinase is not critically involved.

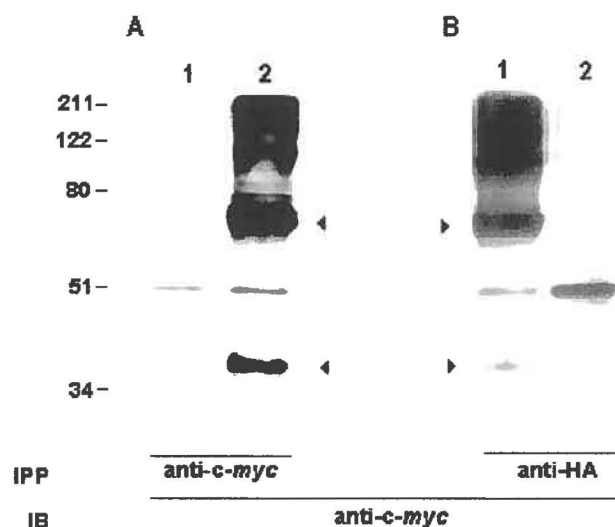
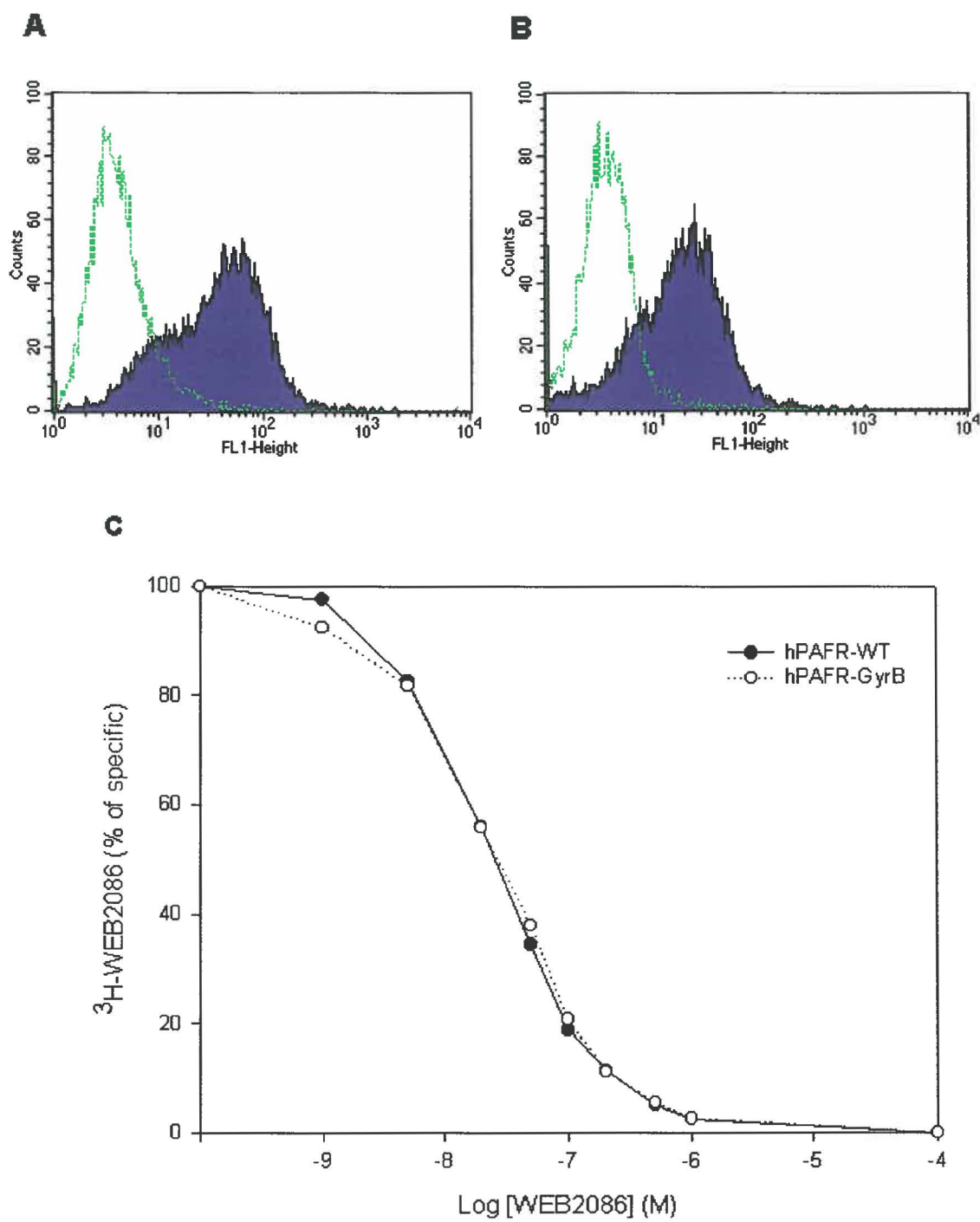


FIG. 1. Detection of human PAFR dimers via Western blotting analysis. COS-7 were transiently transfected either with pcDNA3 (A, lane 1) as a negative control, *c-myc*-tagged hPAFR (A and B, lane 2) or *c-myc*- and HA-tagged hPAFR (B, lane 1). Cell lysates were immunoprecipitated with mouse anti-*c-myc* (A) or anti-HA Abs (B) conjugated to protein A-Sepharose beads, as described under "Materials and Methods". Immunoprecipitated receptors were subjected to 10% SDS-PAGE and detected via Western Blotting using the rabbit anti-*c-myc* Ab. Positions of receptor bands are denoted by arrows and molecular weight markers are shown in the left margin. A result representative of three independent experiments is shown.



FIGURES 2A, B ET C

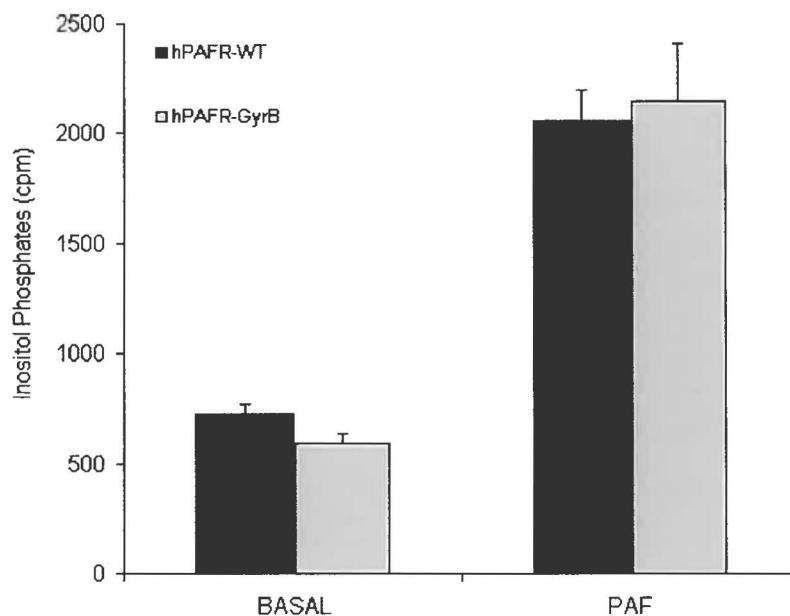
D

FIG. 2. Expression, binding and signaling of wild-type hPAFR and hPAFR-GyrB receptors in CHO cells. Flow cytometric analysis of *c-myc* wild-type (A) and GyrB (B) receptors in stably transfected CHO cells. *Dotted line*, labeling with FITC-goat anti-mouse antibody. *Solid line*, labeling with anti-*c-myc* antibody. C, Competition binding isotherms of [^3H]WEB2086 by WEB2086 in stably transfected CHO cells. Cells were incubated with increasing concentration of WEB2086 and binding responses were determined as described (20). D, Basal and stimulated IP levels in CHO cells expressing wild-type or GyrB PAF receptors. Total IPs were measured as described under "Materials and Methods". The results are representative of three independent experiments.

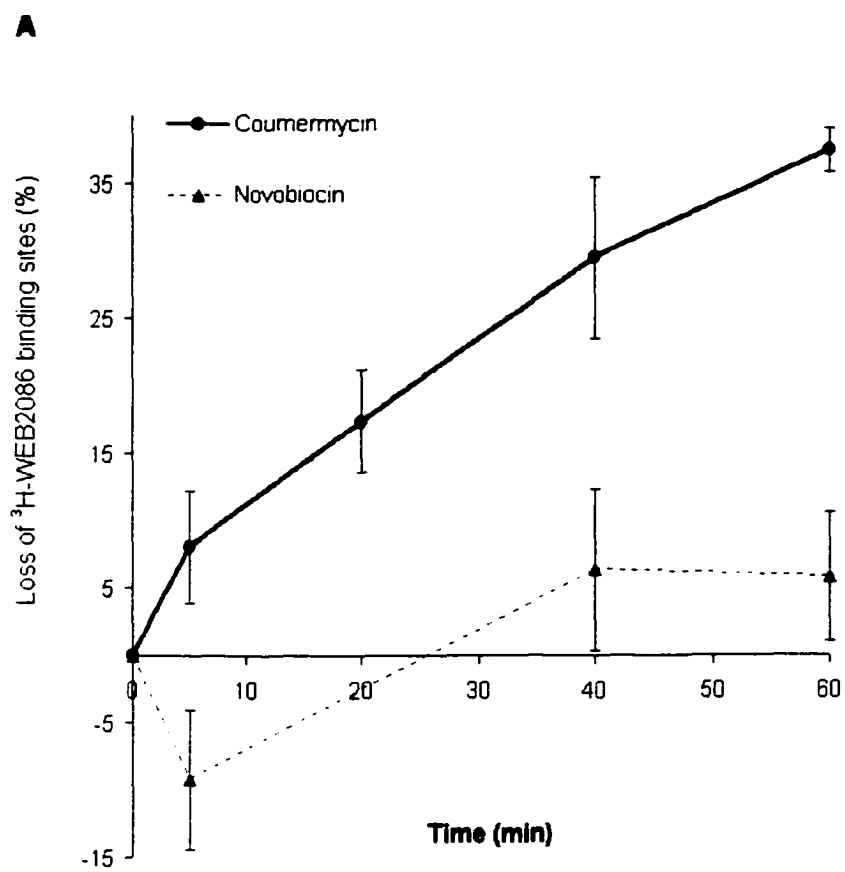


FIGURE 3A

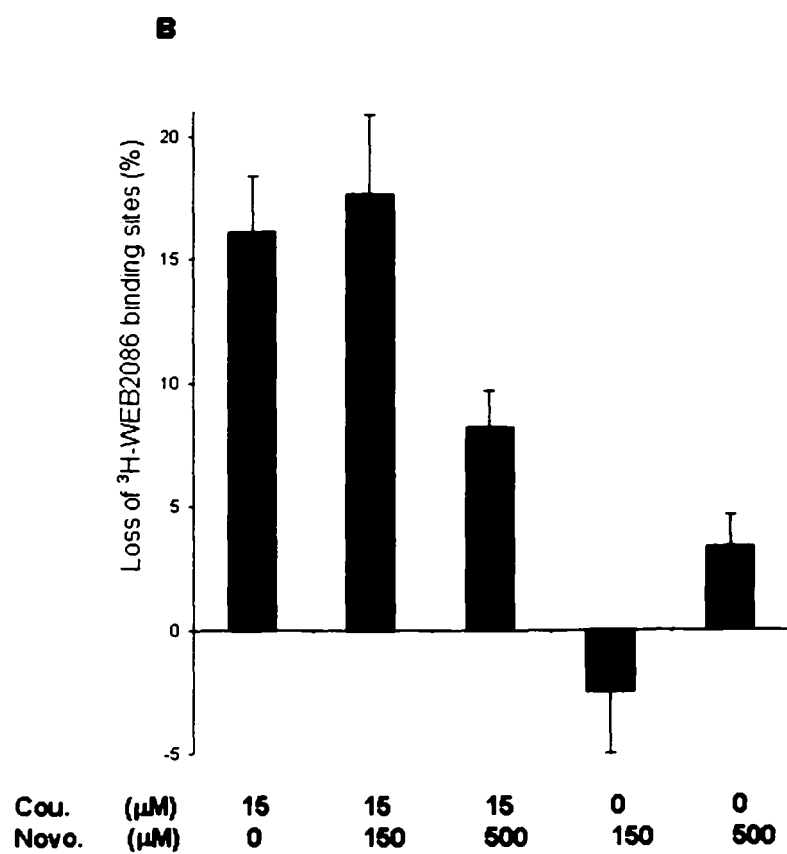


FIGURE 3B

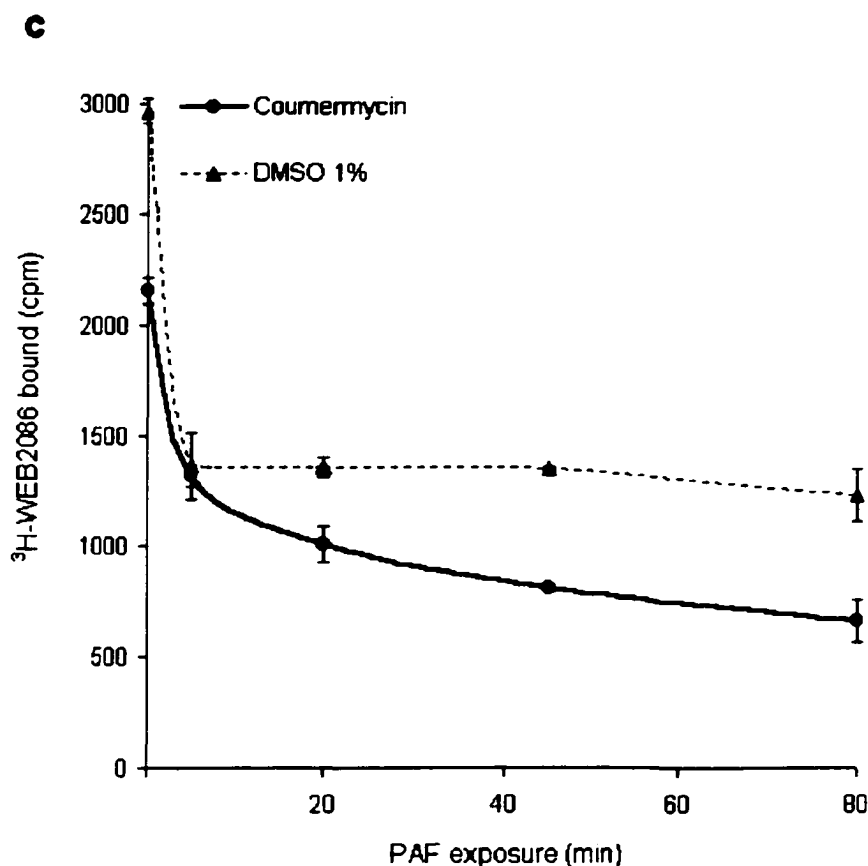


FIG. 3. Coumermycin induces an agonist-independent loss of [3 H]WEB2086 binding to hPAFR-GyrB in stably-transfected CHO cells. A, hPAFR-GyrB-transfected intact cells were treated with coumarins (coumermycin or novobiocin) for the indicated time and total [3 H]WEB2086 binding was measured as described in "Materials and Methods". These data represent the mean of three independent experiments, each done in triplicate. B, Inhibition of coumermycin-induced loss of [3 H]WEB2086 binding by novobiocin. CHO cells stably expressing the hPAFR-GyrB were pretreated with the indicated amount of novobiocin and exposed to coumermycin 20 min later. C, Time course of agonist-induced loss of [3 H]WEB2086 binding to hPAFR-GyrB. Cells were pretreated or not with coumermycin and exposed to PAF for the indicated time. Cells were then washed with 2% BSA and assayed for [3 H]WEB2086 binding. Results shown are representative of 3 independent experiments.

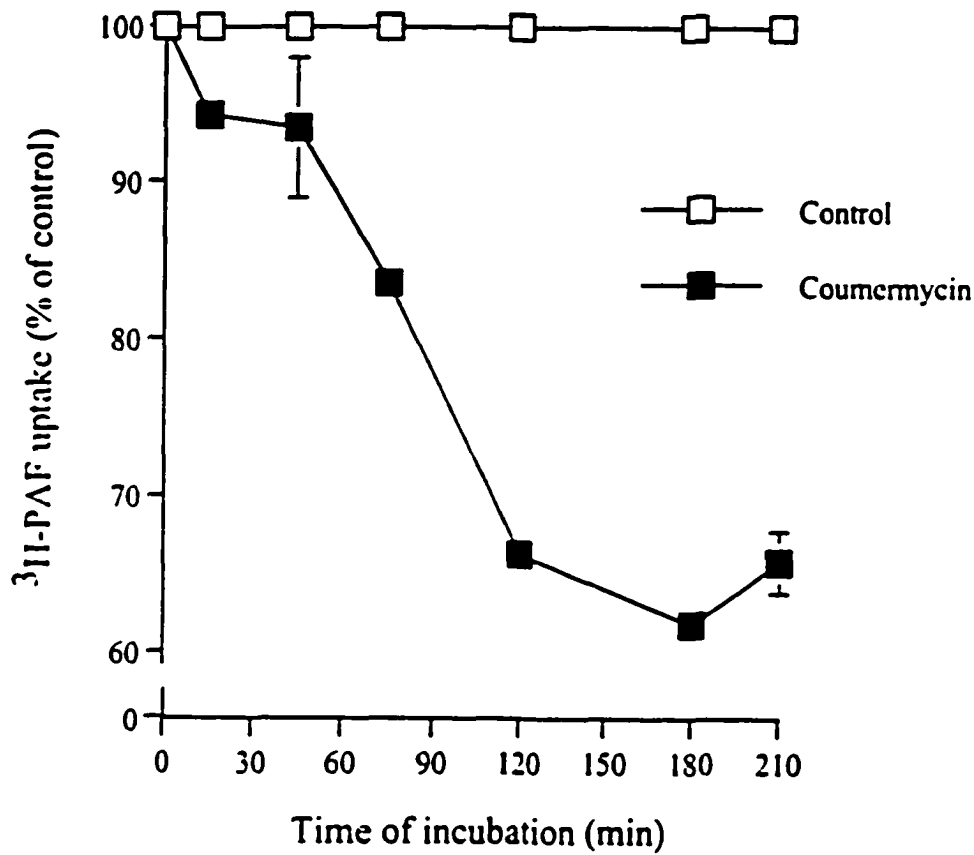
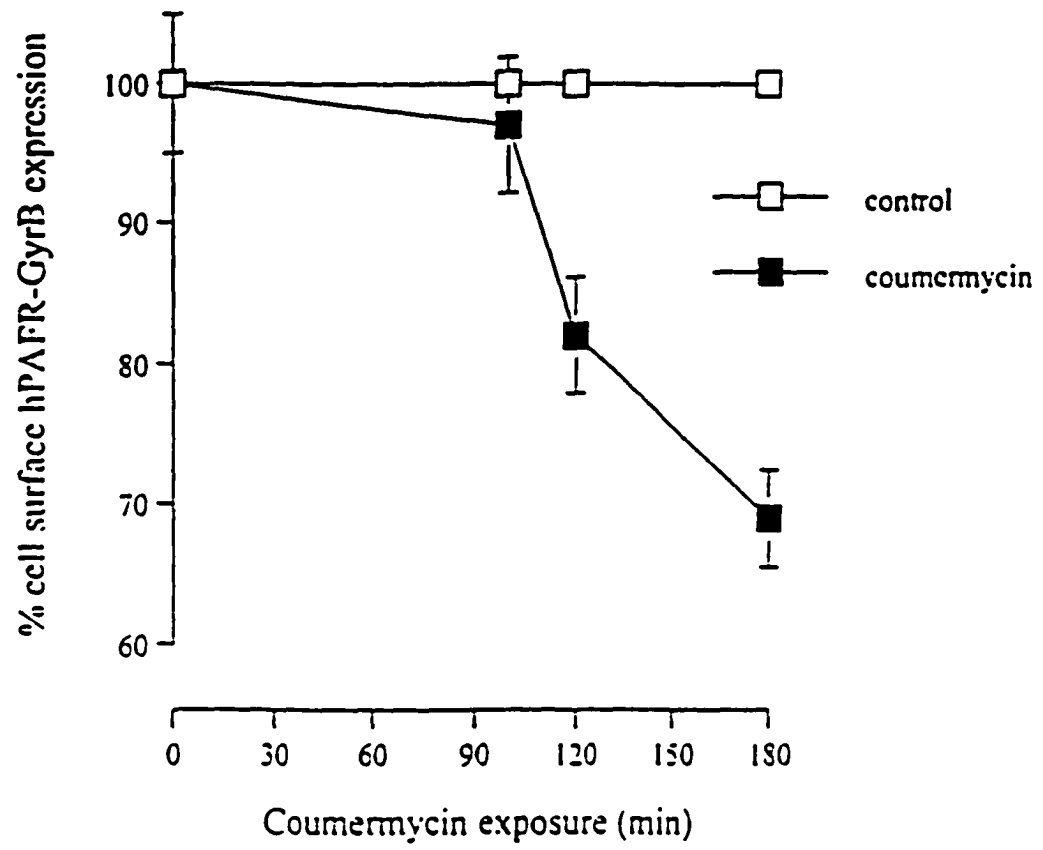


FIG. 4. Effect of coumermycin on the internalization of the hPAFR-GyrB-ligand complex. Following an incubation at 37°C in the presence (●) or absence (○) of coumermycin for the times shown, CHO cells stably expressing the hPAF-GyrB were further exposed to 2 nM [^3H]PAF for 40 min at 37°C. Cells were then washed with BSA 2% to remove surface-bound ligand and dissolved in 0,1 N NaOH. Nonspecific binding values were determined in the presence of 2 μM PAF. The results are the mean of three independent experiments, each done in triplicate.

A**FIGURE 5A**

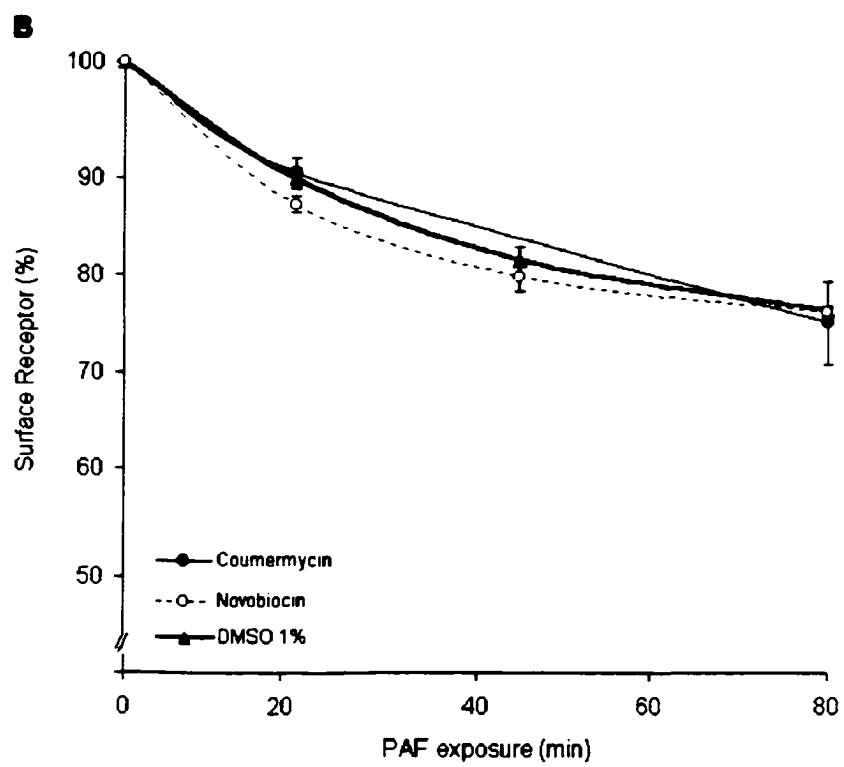


FIGURE 5B

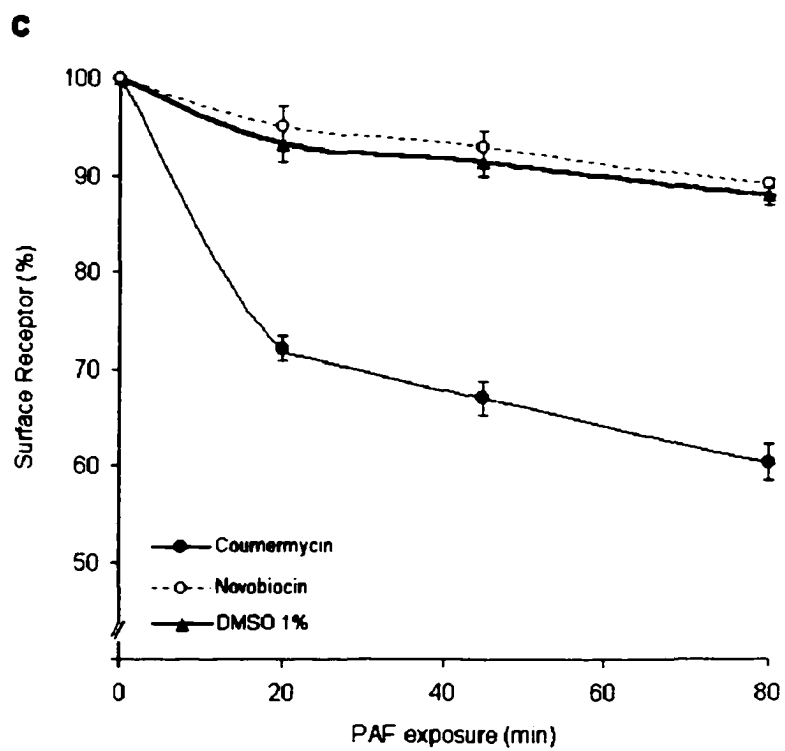


FIGURE 5C

D

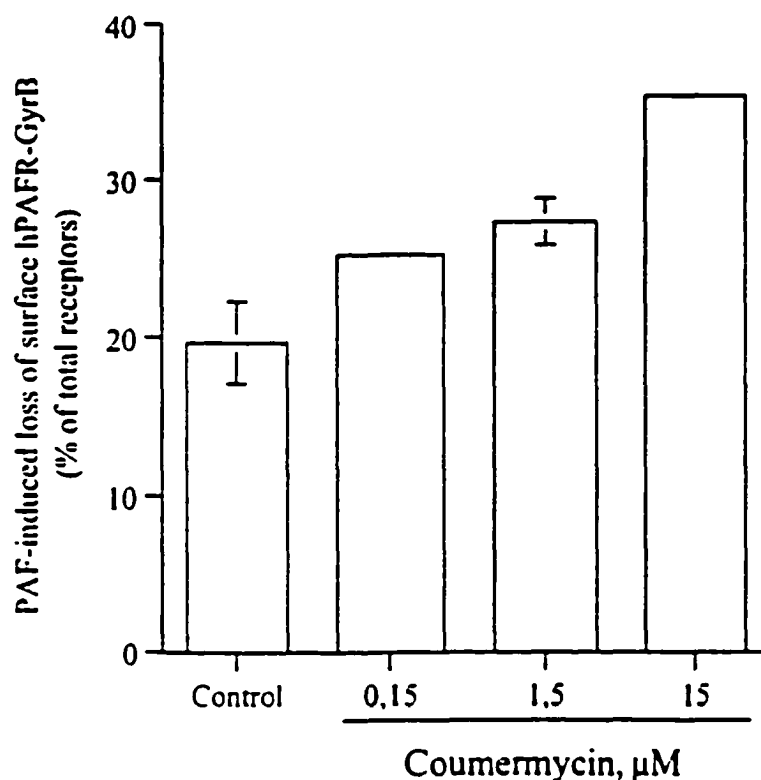


FIG. 5. Flow cytometric analysis of coumermycin-induced sequestration of hPAFR-GyrB in CHO cells. A, Cells were exposed to coumermycin for the times indicated, and cell-surface receptor levels were measured by flow cytometry using anti-c-*myc* antibody. Time course of agonist-induced internalization of c-*myc*-tagged wild-type (B) and GyrB (C) PAF receptors in stably transfected CHO cells. After a 100 min-incubation at 37°C with or without the indicated coumarin (15 μM), cells were exposed to PAF for 0-80 min. D, Agonist response of hPAFR-GyrB-transfected cells to graded concentrations of coumermycin. Cells were pretreated at 37°C for 100 min with coumermycin concentrations ranging from 150 nM to 15 μM and then incubated with PAF at 37°C for 80 min. The proportion of detectable cells surface receptors in the absence of agonist and/or coumarin was normalized to 100%. The data represent means \pm SEM of three independent experiments each performed in triplicate.

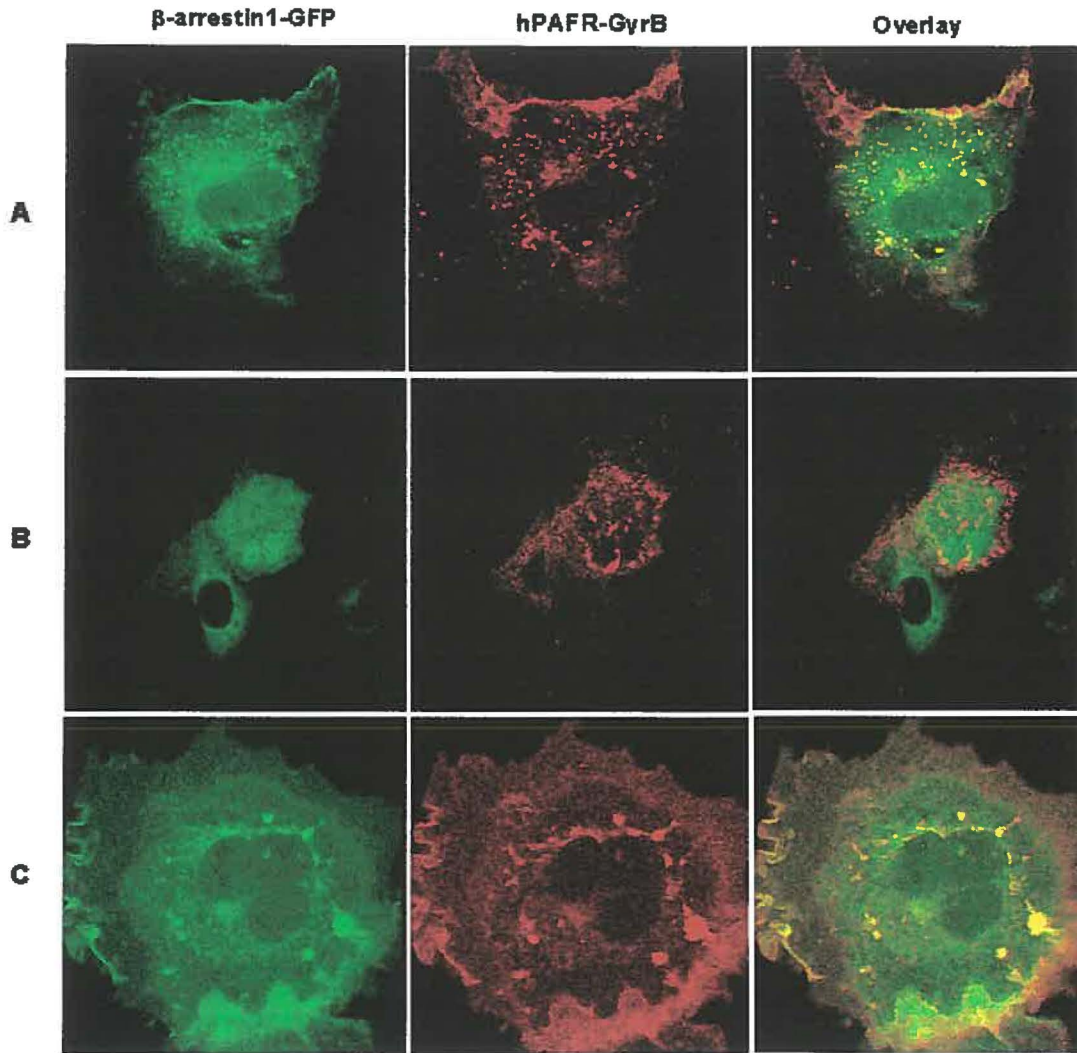


FIG. 6. Distribution of β arr1-GFP and hPAFR-GyrB following stimulation with coumermycin and/or agonist. Confocal microscopy visualization of intracellular distribution and colocalization (yellow) of β arr1-GFP (green) and c-myc epitope-tagged hPAFR-GyrB (red, labeled with rhodamine-conjugated Ab) in COS-7 cells. Following a 180-min incubation at 37°C in the presence (B, C) or absence (A) of 15 μ M coumermycin, COS-7 cells were further incubated with (A,C) or without (B) 1 μ M PAF for 80 min. Cells were then placed on ice, fixed and stained for microscopy. The images are representative of three separate experiments.

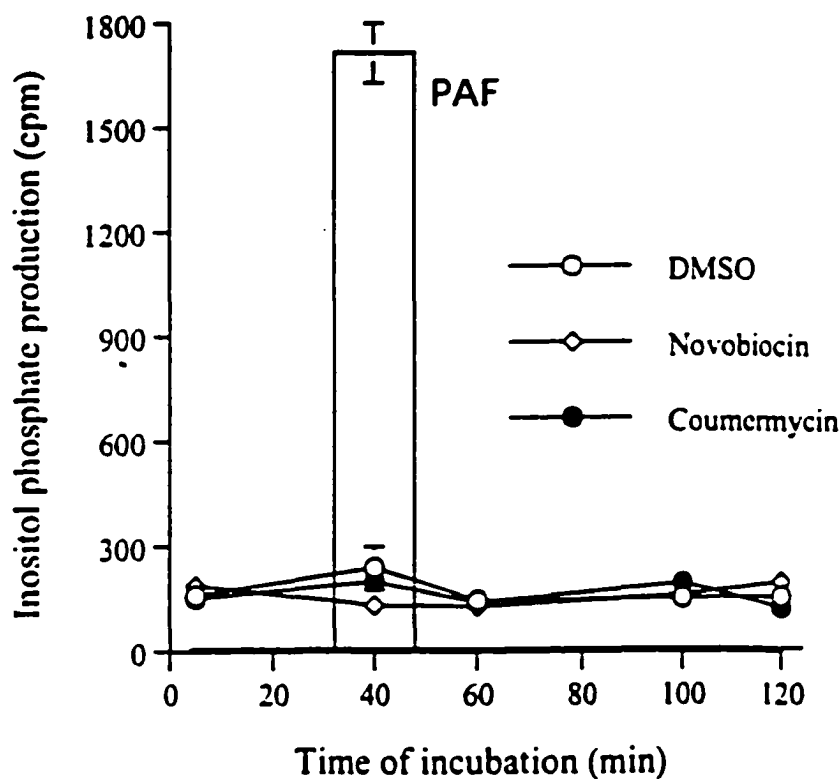


FIG. 7. Inositol Phosphate (IP) accumulation during coumermycin-induced internalization of hPAFR-GyrB in CHO cells. Total IP levels were measured in CHO cells stably expressing hPAFR-GyrB after the addition of 15 μ M coumermycin, 15 μ M novobiocin, DMSO 1% or 1 μ M PAF. The figure is representative of three independent experiments (means \pm SEM).

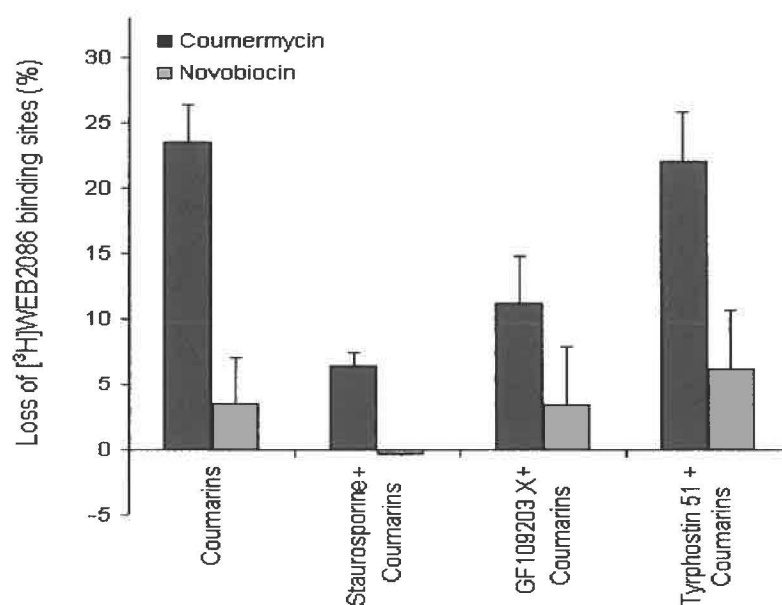


FIG. 8. Effect of protein kinase inhibitors on the coumermycin-induced loss of [^3H]WEB2086 binding sites in CHO cells. Cells were pretreated with either medium, staurosporine, GF109203X or tyrphostin as described in "Materials and Methods". Cells were then incubated with coumarins for 40 min and binding was measured using ^3H -WEB2086. Non specific binding was determined in the presence of 5 μM WEB2086. Results are the means of three independent experiments, each done in triplicate.

DISCUSSION :

In this study, we found that hPAFR can exist as multimers in transfected COS-7 cells using co-expression and immunoprecipitation of receptors bearing different epitope tags. Receptor dimerization has been shown to be important for the activities of many receptor families, including growth factor receptors with tyrosine kinase activity, members of the growth hormone receptor family, cytokine receptors, and bacterial sensory receptors (48, 49). Exposure to ligand induces their dimerization, leading to the autophosphorylation step, which is necessary for the subsequent intracellular signaling. However, the role of dimerization in the function and subsequent regulatory events of GPCRs is not well understood and needs to be clarified.

Using a hPAFR-GyrB chimeric protein, which can be artificially dimerized by coumermycin without involving ligand-receptor interaction, we have shown that dimerization is sufficient to induce desensitization of hPAFR-GyrB. This effect was observed using three different methodologies: (1) loss of ligand ($[^3\text{H}]\text{WEB2086}$) binding, (2) ligand ($[^3\text{H}]\text{PAF}$) internalization and (3) loss of cell surface hPAFR expression. Using a membrane-impermeant antagonist radioligand to estimate changes in binding sites on the cell surface, we first observed that coumermycin induced a rapid loss of $[^3\text{H}]\text{WEB2086}$ binding sites in CHO cells stably expressing the hPAFR-GyrB. Coumermycin mediated-dimerization of hPAFR-GyrB putatively induced a conformational change of the receptor which led initially to a loss of ligand binding capacity, and later to a disappearance of the unoccupied hPAFR-GyrB from the cell surface. Both mechanisms may explain the reduced intracellular accumulation of receptor-bound $[^3\text{H}]\text{PAF}$ in coumermycin-pretreated cells compared to cells treated only with agonist. Furthermore, analysis of the disappearance of cell surface receptors by flow cytometry

provided for the first time a direct evidence demonstrating agonist-independent internalization of a GPCR mediated by coumermycin-induced dimerization. However, dimerization-induced sequestration is not observed for all GPCRs. For instance, the interconversion between dimeric and monomeric forms of δ -opioid receptor has been shown to precede internalization but appears not to be sufficient for its internalization (22). Moreover, the subsequent addition of PAF to coumermycin-treated cells showed that the agonist-induced internalization and coumermycin-mediated sequestration are additive to each other, playing a complementary role in the desensitization of hPAFR-GyrB. However, we were unable to detect the coumermycin-gyrase B-induced dimerization of hPAFR-GyrB on SDS-PAGE and Western analysis, most probably due the inability of the coumermycin-hPAFR-GyrB complex to withstand either the cell lysis or immunoprecipitation conditions.

Previous results suggest that GPCR kinases (GRKs), are the primary protein kinases involved in agonist-induced phosphorylation of hPAFR (50). However, the desensitization of PAFR in human neutrophils by its own ligand has been reported to be prevented by PKC inhibition (51). In addition to agonist-specific receptor desensitization, functions of GPCRs can be regulated by agonist-independent mechanisms, namely, heterologous desensitization, which has been shown to be implicated in the heterologous regulation of a number of GPCRs (52-54). In the present study, we have demonstrated that coumermycin induces a PKC-dependent loss of [3 H]WEB2086 binding sites from the cell surface. The phorbol ester PMA, which is a potent activator of the PKC isoenzyme family, has already been shown to reduce the number of PAF-binding sites in human neutrophils (51) and rat Kupffer cells (55). In these cases, functional down-regulation of PAFR is very rapid, occurring within seconds or minutes. The molecular mechanism responsible for this phenomenon likely involves internalization or

cellular redistribution of the PAFR (56). Moreover, we have previously shown that PKC activation can induce a early time-dependent decrease in total binding of [3 H]WEB2086 and a long term effect on PAFR, resulting from a gradual loss of receptor expression as a consequence of a decreased stability of receptor mRNA (57). Consistent with these observations, the coumermycin-mediated activation of PKC could constitute a regulatory mechanism for hPAFR-GyrB response, leading to a reduced surface expression of the receptor, which is preceded by a rapid loss of [3 H]WEB2086 binding sites from the cell surface. Thus, our present results suggest that coumermycin-induced dimerization of hPAFR-GyrB could have a role either directly in the receptor activation mechanism, stabilizing interactions between domains critical for the conversion between inactive and active state or, alternatively, in the subsequent PKC-dependent desensitization and/or initiation of the sequestration process.

Our studies delineating the cellular mechanism responsible for coumermycin-induced internalization of hPAFR-GyrB have shown that sequestration occurred in a clathrin and arrestin-independent manner, whereas a subsequent treatment with the agonist mediated an arrestin-dependent sequestration of the receptor. The coumermycin-induced internalization of hPAFR-GyrB is characterized by the fact that we observed no translocation/redistribution of arrestins and detected no colocalization with the receptor. The endocytic function of arr2 is reported to depend on its phosphorylation/dephosphorylation state (58). Arrestin-2 recruited to the plasma membrane-bound receptor has been demonstrated to be rapidly dephosphorylated, whereas cytoplasmic β arr-1 is primarily phosphorylated. The nature of the kinase(s) that is responsible for this phosphorylation is currently unknown. It is possible that the agonist-independent internalization of hPAFR-GyrB could induce the phosphorylation of arr2 by PKC, which may be responsible for its cytoplasmic location following the coumermycin treatment.

In addition, the enzymatic pathway involved in PKC-dependent hPAFR-GyrB desensitization/internalization mediated by coumermycin could involve either direct phosphorylation of the receptor by PKC or activation of other signaling molecules by PKC. We cannot rule out the possibility that PKC may promote desensitization of hPAFR-GyrB through phosphorylation of some adaptor-like protein that target the receptor to endocytic vesicles. Indeed, PICK1 which is a PDZ domain-containing protein, first described as a protein interacting with PKC, has recently been shown to interact via its PDZ domain with the extreme C-terminus of the AMPA receptor subunit GluR2, resulting in the clustering of this subunit into intracellular membrane compartments (59).

The potential involvement of PLC activation in the internalization process was considered following the report that the AP-2 complex could bind to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (60) and inositol 1,4,5-trisphosphate (61). However, the agonist-independent sequestration induced by coumermycin did not induce accumulation of IP, suggesting that PLC activation does not participate in this alternative sequestration pathway. As described for other GPCRs (62), coumermycin-mediated hPAFR-GyrB sequestration may be independent from signal transduction.

In conclusion, we have demonstrated that coumermycin-induced dimerization of hPAFR-GyrB can be sufficient to induce the desensitization/internalization of hPAFR-GyrB via a novel mechanism that is independent of agonist, arrestins, clathrin, and PLC activation. We have also observed that the same receptor could use two different internalization pathways depending on the nature of the stimulation. Furthermore, we have demonstrated that PKC is required for the coumermycin-mediated desensitization of hPAFR-GyrB. Understanding the mechanism by which PKC activation may regulate the agonist-independent desensitization of

hPAFR-GyrB will yield a better understanding of dimerization-mediated internalization of GPCRs.

REFERENCES :

1. Snyder, F. (1990) *Am. J. Physiol.* **259**, 697-708.
2. Venable, M.E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. and Prescott, S.M. (1993) *J. Lipid Res.* **34**, 691-702.
3. Chao, W. and Olson, M.S. (1993) *Biochem. J.* **292**, 617-629.
4. Evangelou, A.M. (1994) *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **50**, 1-28.
5. Imaizumi, T.A., Stafforini, D.M., Yamada, Y., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. and Zimmerman, G.A. (1995) *J. Intern. Med.* **238**, 5-20.
6. Izumi, T. and Shimizu, T. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1259**, 317-333.
7. Ali, H., Richardson, R.M., Tomhave, E.D., DuBose, R.A., Haribabu, B. and Snyderman, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24557-24563.
8. Bito, H. and Shimizu, T. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **400**, 215-221.
9. Ferguson, S.S. (2001) *Pharmacol. Rev.* **53**, 1-24.
10. Tsao, P. and von Zastrow, M. (2000) *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 365-369.
11. Bunemann, M. and Hosey, M.M. (1999) *J. Physiol.* **517**, 5-23.
12. Krupnick, J.G. and Benovic, J.L. (1998) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 289-319.
13. Lefkowitz, R.J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18677-18680.
14. Vickery, R.G. and von Zastrow, M. (1999) *J. Cell. Biol.* **144**, 31-43.
15. Zhang, J., Ferguson, S.S., Barak, L.S., Menard, L. and Caron, M.G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18302-18305.
16. Pals-Rylaarsdam, R., Gurevich, V.V., Lee, K.B., Ptasienski, J.A., Benovic, J.L. and Hosey, M.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23682-23689.
17. Werbonat, Y., Kleutges, N., Jakobs, K.H. and van Koppen, C.J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 21969-21974.
18. Gilbert, T.L., Bennett, T.A., Maestas, D.C., Cimino, D.F. and Prossnitz, E.R. (2001) *Biochemistry* **40**, 3467-3475.

19. Ye, R.D., Prossnitz, E.R., Zou, A.H. and Cochrane, C.G. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 105-111.
20. Le Gouill, C., Parent, J.L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21289-21295.
21. Hebert, T.E., Moffett, S., Morello, J.P., Loisel, T.P., Bichet, D.G., Barret, C. and Bouvier, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 16384-16392.
22. Cvejic, S. and Devi, L.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26959-26964.
23. Rodriguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., de Ana, A.M., Albar, J.P., Martinez-A, C. and Mellado, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3628-3633.
24. Rodriguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., Martin, A., Nieto, M., Sanchez-Madrid, F., Proudfoot, A.E., Wells, T.N., Martinez-A, C. and Mellado, M. (1999) *J. Cell. Biol.* **144**, 755-765.
25. George, S.R., Lee, S.P., Varghese, G., Zeman, P.R., Seeman, P., Ng, G.Y. and O'Dowd, B.F. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30244-30248.
26. Ng, G.Y., O'Dowd, B.F., Lee, S.P., Chung, H.T., Brann, M.R., Seeman, P. and George, S.R. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 200-204.
27. Nimchinsky, E.A., Hof, P.R., Janssen, W.G., Morrison, J.H. and Schmauss, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29229-29237.
28. Potter, L.T., Ballesteros, L.A., Bichajian, L.H., Ferrendelli, C.A., Fisher, A., Hanchett, H.E. and Zhang, R. (1991) *Mol. Pharmacol.* **39**, 211-221.
29. Zeng, F. and Wess, J. (2000) *Neuropsychopharmacology* **23**, S19-31.
30. Zhang, Z., Sun, S., Quinn, S.J., Brown, E.M. and Bai, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 5316-5322.
31. Monnot, C., Bihoreau, C., Conchon, S., Curnow, K.M., Corvol, P. and Clauser, E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 1507-15013.
32. Romano, C., Yang, W.L. and O'Malley, K.L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 28612-28616.
33. Gether, U. (2000) *Endocr. Rev.* **21**, 90-113.
34. Le Gouill, C., Parent, J.L., Caron, C.A., Gaudreau, R., Volkov, L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12548-12554.
35. Farrar, M.A., Alberol-Ila and Perlmutter, R.M. (1996) *Nature* **383**, 178-181.

36. Gilbert, E.J. and Maxwell, A. (1994) *Mol. Microbiol.* **12**, 365-373.
37. Ali, J.A., Jackson, A.P., Howells, A.J. and Maxwell, A. (1993) *Biochemistry* **32**, 2717-2724.
38. Parent, J.L., Gouill, C.L., Escher, E., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 23298-23303.
39. Martin, T.F. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14816-14822.
40. Berridge, M.J., Dawson, R.M., Downes, C.P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F. (1983) *Biochem. J.* **212**, 473-482.
41. Shimizu, T., Mutoh, H. and Kato, S. (1996) *Adv. Exp. Med. Biol.* **416**, 79-84.
42. Barak, L.S., Ferguson, S.S., Zhang, J. and Caron, M.G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27497-27500.
43. Ferguson, S.S., Menard, L., Barak, L.S., Koch, W.J., Colapietro, A.M. and Caron, M.G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24782-24789.
44. Walker, J.K., Premont, R.T., Barak, L.S., Caron, M.G. and Shetzline, M.A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 31515-31523.
45. Barak, L.S., Warabi, K., Feng, X., Caron, M.G. and Kwatra, M.M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7565-7569.
46. McConalogue, K., Dery, O., Lovett, M., Wong, H., Walsh, J.H., Grady, E.F. and Bunnett, N.W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16257-16268.
47. Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G. and Ferguson, S.S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10999-11006.
48. Heldin, C.H. (1995) *Cell* **80**, 213-323.
49. Stoddard, B.L., Biemann, H.P. and Koshland, D.E. (1992) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **57**, 1-15.
50. Ishii, I., Saito, E., Izumi, T., Ui, M., and Shimizu, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 9878-9885.
51. O'Flaherty, J. T., Jacobson, D. P., and Redman, J. F. (1992) *Biochem. J.* **288**, 241-248.
52. Vazquez-Prado, J., Medina, L.C. and Garcia-Sainz, J.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27330-27337.
53. Hipkin, R.W., Wang, Y. and Schonbrunn, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5591-5599.

54. Xiang, B., Yu, G.H., Guo, J., Chen, L., Hu, W., Pei, G. and Ma, L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 4709-4716.
55. Chao, W., Liu, H., Hanahan, D. J., and Olson, M. S. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **282**, 188-197.
56. Zhou, W. and Olson, M. S. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **313**, 179-183.
57. Thivierge, M., Parent, J. L., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (1996) *J. Immunol.* **157**, 4681-4687.
58. Lin, F.T., Krueger, K.M., Kendall, H.E., Daaka, Y., Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A. and Lefkowitz, R.J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31051-31057.
59. Chung, H.J., Xia, J., Scannevin, R.H., Zhang, X. and Huganir, R.L. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 7258-7267.
60. Beck, K.A. and Keen, J.H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4442-4447.
61. Voglmaier, S.M., Keen, J.H., Murphy, J.E., Ferris, C.D., Prestwich, G.D., Snyder, S.H. and Theibert, A.B. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 158-163.
62. Hunyady, L., Baukal, A.J., Balla, T., and Catt, K.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24798-24804.

D. Discussion :

Les interactions protéine-protéine sont impliquées dans la régulation d'un grand nombre de processus biologiques. Il est maintenant bien établi qu'une grande variété de récepteurs membranaires interagissent entre eux pour former une espèce dimérique essentielle à leur activation. On a longtemps cru que les GPCRs échappaient à cette règle. En effet, les modèles classiques décrivant l'interaction des GPCRs avec leur protéine G hétérotrimérique sont en grande partie basés sur l'assumption selon laquelle les récepteurs existent sous une forme monomérique et se couplent aux protéines G selon une stoechiométrie de 1:1. Au cours des dernières années, plusieurs études ont toutefois rapporté non seulement la présence, mais aussi un rôle pour les multimères de GPCRs dans la modulation de la réponse de ces récepteurs (Salahpour et al., 2000). De plus, notre laboratoire a précédemment démontré que la coexpression de certains récepteurs mutants du hPAFR peut être utilisée pour modifier des caractéristiques spécifiques du récepteur de type sauvage (Le Gouill et al., 1999). Cependant, même si ces résultats concordent avec la présence d'oligomères, ils ne constituent pas une preuve directe démontrant l'existence physique de ce type d'interaction.

À l'aide d'études de coexpression et d'immunoprécipitation de récepteurs portant différents épitopes, nous avons démontré que le hPAFR pouvait exister sous la forme de dimères résistants au SDS dans des cellules COS-7 (Fig. 1 de l'article). Même si le mécanisme détaillé de la dimérisation des récepteurs n'est pas encore élucidé, différentes régions des GPCRs semblent jouer un rôle important dans leur oligomérisation (Gomes et al., 2001). Par des études d'immunoprécipitation en conditions réductrices, nous avons tout d'abord montré que la dimérisation du hPAFR semble être en partie médiée par des ponts disulfures.

Différents agents réducteurs tels que le dithiothreitol et le β -mercaptoéthanol semblent ainsi favoriser la forme monomérique du récepteur aux dépens de la forme dimérique qui manifeste une sensibilité au clivage de ponts disulfures (Fig. 9 de l'annexe). On ne sait toutefois pas encore quelles cystéines sont responsables de la formation de ces ponts disulfures intermoléculaires. Il est également important de noter que la destruction du pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines des positions 90 et 173 (Le Gouill et al., 1997) pourrait potentiellement engendrer une modification au niveau de la conformation du récepteur, rendant ainsi sa dimérisation plus difficile. Étant donné qu'une partie des dimères semble être résistante aux agents réducteurs, d'autres types d'interactions de nature non covalentes pourraient potentiellement être responsables de la dimérisation du hPAFR. La région distale de la queue C-terminale du récepteur ne semble cependant pas être responsable de la formation de ce type d'espèce moléculaire car la présence de dimères a été rapportée pour le mutant T305Stop dont les 38 derniers acides aminés de la queue C-terminale ont été délétés (Fig. 10 de l'annexe). D'autres déterminants tels que les domaines transmembranaires, semblent également être responsables de la formation de dimères chez les GPCRs. Le motif de dimérisation de la glycophorine A (Lemmon et al., 1992) antérieurement rapporté comme étant conservé et responsable de la dimérisation du β_2 AR (Hebert et al., 1996) n'est cependant pas retrouvé dans la séquence du récepteur du PAF. D'autres études ont démontré l'importance de l'assemblage des protéines SNAREs synaptobrevine/VAMP, syntaxine et SNAP-25 en un complexe binaire et tertiaire impliqué dans l'ancrage et la fusion de vésicules présynaptiques à la membrane plasmique (Söllner et al., 1993, 1993b). L'interaction entre les segments transmembranaires semble ainsi stabiliser le complexe SNAREs par l'entremise d'un motif contribuant à l'hétérodimérisation de la synaptobrevine à la syntaxine 1A neuronale (Laage et

al., 2000). Nous avons ainsi noté la présence de ce motif dans le sixième domaine transmembranaire du hPAFR, ce qui pourrait potentiellement contribuer à la dimérisation du récepteur. Cette hypothèse reste toutefois à être démontrée.

Nous avons également observé que le hPAFR se présente majoritairement sous la forme dimérique et ce, en l'absence de toute source de stimulation extérieure, lorsqu'il est exprimé dans les cellules COS-7 (Figure 1 de l'article). Il a été rapporté que les GPCRs tendent à adopter un état dimérique sous des conditions natives via des interactions hydrophobes (AbdAlla et al., 1996). L'agglomération des récepteurs au niveau des domaines transmembranaires non polaires pourrait notamment être amenée par une haute densité de récepteurs découlant potentiellement de la surexpression de ceux-ci. Il reste toutefois à déterminer si, en plus de la dimérisation induite par l'agoniste dont le rôle a été démontré dans les processus d'atténuation du BK2R (AbdAlla et al., 1996), l'agglomération de récepteurs sous des conditions basales représente un mécanisme additionnel dans la régulation de l'activité des GPCRs.

Depuis tout récemment, des évidences considérables ont amené l'hypothèse de l'importance de l'hétérodimérisation entre différents sous-types de récepteurs apparentés. On ne sait toutefois que peu de choses concernant ce type d'interaction entre des GPCRs de différentes familles (Gomes et al., 2001). Par des études de coimmunoprécipitation de GPCRs étiquetés à l'aide de deux épitopes différents, nous avons démontré que le récepteur du hPAFR pouvait former une interaction résistante au SDS avec le récepteur de la vasopressine de type 2 (V₂R) dans des cellules COS-7 (Fig. 11 de l'annexe). L'hétérodimérisation du hPAFR avec le V₂R est également sélective car le hPAFR n'est pas coimmunoprécipité avec le β_2 AR. Cependant, le rôle de l'hétérodimérisation du hPAFR/V₂R dans le ciblage et la signalisation de

ces deux récepteurs est encore inconnu. Une implication fonctionnelle pourrait ainsi découler de ce type d'interaction qui, dans ce cas-ci, a la particularité de se produire entre un récepteur couplé à une protéine G stimulatrice de l'adénylate cyclase, le V₂R, et un récepteur couplé à une protéine G inhibitrice, le hPAFR. Ce type de situation a précédemment été rapporté pour l'hétérodimérisation du récepteur β_2 AR avec les récepteurs δ et κ opioïdes où l'hétérodimérisation ne semble pas affecter les capacités de liaison du ligand ou le couplage fonctionnel, mais influence plutôt les propriétés d'internalisation et de signalisation des récepteurs impliqués (Jordan et al., 2001).

Il a été démontré que l'homodimérisation peut jouer un rôle important dans les étapes moléculaires gouvernant l'activation des GPCRs (Hebert et al., 1998). Nous avons ainsi étudié le rôle de la dimérisation dans le processus de désensibilisation des GPCRs à l'aide de la protéine de fusion hPAFR-GyrB dont la dimérisation pouvait être induite suite à l'addition de coumermycine. À partir de ce système, nous avons démontré que la dimérisation forcée par l'entremise d'un agent de réticulation (coumermycine) était, en elle seule, suffisante pour déclencher le processus de désensibilisation du récepteur. Cet effet a ainsi été observé à l'aide de trois méthodologies différentes : la perte de sites de liaison pour un antagoniste radiomarqué (WEB2086), l'internalisation de complexes ligand radiomarqué (PAF)-récepteur de même que par une perte de l'expression de surface du hPAFR-GyrB. En utilisant un antagoniste imperméable à la membrane, nous avons tout d'abord noté que la coumermycine était en mesure d'induire une perte rapide de sites de liaison pour le [³H]WEB2086 dans des cellules CHO exprimant le récepteur de façon stable (Fig. 3A de l'article). Les effets de la coumermycine sont visibles dès 5 minutes et atteignent un plateau au bout d'une heure,

correspondant à une baisse de sites de liaison pour l'antagoniste de $37 \pm 2\%$ par rapport au témoin.

Diverses études suggèrent que les GRKs sont les principales protéines kinases impliquées dans la phosphorylation homologue induite par l'agoniste (Schwiebert et al., 1992; Exton et al., 1994; Liang et al., 1998). Cependant, la désensibilisation du hPAFR induite par son ligand peut être prévenue par l'inhibition de la PKC chez les neutrophiles (O'Flaherty et al., 1992). En plus de ce type de désensibilisation, les GPCRs peuvent également être régulés par des mécanismes indépendants de l'agoniste qui ont récemment été démontrés comme étant à l'origine de la régulation hétérologue de nombreux GPCRs (Vazquez-Prado et al., 1997; Hipkin et al., 2000; Xiang et al., 2001). En utilisant des inhibiteurs spécifiques à la PKC (staurosporine, GF109203X), nous avons ainsi été en mesure d'atténuer la perte de sites de liaison du [3 H]WEB2086 observée en présence de coumermycine. Cette observation démontre alors l'implication de la PKC dans le phénomène de désensibilisation du hPAFR-GyrB induit par sa dimérisation forcée. D'autres études ont rapporté que l'ester de phorbol (PMA), un puissant activateur des isoenzymes de la famille de la PKC, était en mesure d'induire une réduction du nombre de sites de liaison pour le PAF chez les neutrophiles humains (O'Flaherty et al., 1992) et les cellules de Kupffer de rat (Chao et al., 1990). Dans ces cas, la régulation négative du nombre total de récepteurs à la surface cellulaire se produit très rapidement, soit au bout de quelques secondes ou minutes. Les mécanismes moléculaires responsables de ce phénomène semblent impliquer un processus d'internalisation ou de redistribution du PAFR (Zhou et al., 1994). De plus, nous avons déjà démontré que l'activation de la PKC pouvait induire une diminution rapide des sites totaux de liaison pour le [3 H]WEB2086 de même qu'un effet à long terme sur le PAFR, résultant d'une perte graduelle de l'expression du récepteur qui

est expliquée par une diminution de la stabilité de l'ARN messager du récepteur (Thivierge et al., 1996). En accord avec ces observations, l'activation de la PKC médiée par la coumermycine pourrait ainsi constituer un mécanisme de régulation de la réponse du hPAFR-GyrB, menant à une perte d'expression du récepteur, précédée par une perte rapide de liaison du [³H]WEB2086 à la surface cellulaire. Ce phénomène pourrait, par conséquent, être à l'origine de la diminution d'accumulation intracellulaire du [³H]PAF lié aux récepteurs qui a été observée chez les cellules prétraitées à la coumermycine comparativement à celles traitées uniquement en présence de l'agoniste (Fig. 4 de l'article).

Les expériences de cytofluorométrie ont ensuite apporté, pour la toute première fois, une évidence directe démontrant l'internalisation d'un GPCR induite par sa dimérisation et ce, indépendamment du ligand (Fig 5A de l'article). Contrairement à la désensibilisation qui survient rapidement, la perte d'expression du hPAFR à la surface cellulaire induite par la dimérisation est toutefois beaucoup plus lente. Cette observation amène ainsi l'hypothèse selon laquelle différents mécanismes pourraient être à l'origine de la désensibilisation du hPAFR-GyrB suite à une exposition courte ou prolongée à la coumermycine. Ainsi, l'activation de la PKC par l'agent réticulant pourrait ainsi être à l'origine des événements précoces de désensibilisation tels que la phosphorylation du récepteur, le découplage et/ou l'internalisation, qui pourraient ainsi entraîner la perte de liaison pour le [³H]WEB2086 observée dans les premières minutes suivant la stimulation. La perte d'expression de surface pourrait, tant qu'à elle, être le résultat combiné de l'internalisation du récepteur et d'une potentielle perte d'accumulation de l'ARN messager du récepteur comme mentionné dans le cas de la PMA pour le PAFR (Thivierge et al., 1996). Finalement, l'addition subséquente de PAF aux cellules prétraitées à la coumermycine a démontré que l'internalisation induite par

l'agoniste et la séquestration médiée par la coumermycine sont deux phénomènes additifs (Fig. 5C de l'article) qui peuvent alors jouer un rôle complémentaire dans la désensibilisation du hPAFR-GyrB et qui suggèrent donc des voies d'activation au moins partiellement distinctes. Nous n'avons cependant pas été en mesure de détecter la modulation de la dimérisation induite par la coumermycine par analyse SDS-PAGE et Western, et ce, probablement en raison du manque de stabilité du complexe coumermycin-hPAFR-GyrB lors des conditions de lyse cellulaire utilisées. Un problème du même ordre avait également été rencontré lors des études de dimérisation de Stat3 (O'Farrell et al., 1998).

Ces observations apportent alors une évidence directe concernant l'implication de la dimérisation dans un processus fonctionnel des GPCRs, soit l'internalisation. Ce phénomène pourrait ainsi être applicable pour différents GPCRs et supporter, par conséquent, certains cas observés où l'évidence directe de l'implication de la dimérisation dans l'internalisation était manquante. Par exemple, dans le cas du récepteur de la bradykinine B2 (BK2R), il a été démontré que la délétion de la queue N-terminale du récepteur était, à elle seule, suffisante pour abolir la dimérisation du récepteur et sa phosphorylation par la GRK2 (AbdAlla et al., 1999). De plus, ce récepteur mutant ne semble pas subir de désensibilisation ou d'internalisation significative induite par l'agoniste, suggérant ainsi l'hypothèse selon laquelle la dimérisation du BK2R induite par l'agoniste se produit à la suite de l'activation des protéines G mais précède cependant les étapes de phosphorylation du récepteur ainsi que sa désensibilisation subséquente.

Il est également important de noter que l'état dimérique des récepteurs peut être considéré comme arbitraire car des espèces d'un ordre oligomérique supérieur ont déjà été rapportées chez certains GPCRs (Gomes et al., 2001). Par exemple, dans le cas du récepteur

m2 muscarinique. on observe différents multiples de l'espèce monomérique du récepteur avec des mobilités électrophorétiques correspondant à la présence d'un ordre trimérique et tétramérique (Wreggett et al., 1995). De plus, le profil de liaison coopérative du ligand observé pour récepteur m2 muscarinique décrit par Wreggett et Wells (Wreggett et al., 1995) semble plutôt correspondre à un modèle qui assume la présence d'une configuration tétramérique du récepteur qui pourrait représenter la forme active du récepteur. La présence de multimères a également été signalée dans le cas du hPAFR par des études de phosphorylation (Ali et al., 1994; Ishii et al., 1998) que nous avons ensuite confirmées à l'aide d'essais de coimmunoprécipitation du récepteur où la présence d'espèces de haut poids moléculaire est évidente (Fig 1B de l'article). Une autre étude a démontré que le phénotype induit par la coexpression du récepteur du PAF de type sauvage avec un mutant du récepteur, le D63N, est dirigé par le ratio de la quantité d'ADN utilisée pour chacun des récepteurs (Le Gouill et al., 1999). Ainsi, suite à une activation par le PAF, la production d'inositol phosphate produite par des cellules cotransfectées avec un ratio de 1 pour le type sauvage et de 1 pour le D63N était supérieure à celle observée pour les cellules transfectées avec le récepteur de type sauvage uniquement, tandis qu'elle était abolie pour les cellules transfectées avec un ratio de 1 :3. L'internalisation du hPAFR pourrait ainsi être également influencée par l'ordre oligomérique du récepteur et expliquer l'effet de la coumermycine sur la séquestration du hPAFR qui semble déjà être présent selon une proportion majoritairement dimérique (Fig 1 de l'article). La dimérisation du hPAFR-GyrB induite par la coumermycine pourrait ainsi potentiellement induire la dimérisation de récepteurs en partie dimériques, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la séquestration du récepteur par rapport à celle obtenue uniquement en présence de l'agoniste. L'effet de l'agoniste sur la proportion des dimères/monomères n'a

toutefois pu être évalué directement car la méthode utilisée présentait une marge d'erreur trop grande par rapport à l'effet mesuré, qui s'est ainsi avéré non significatif.

Nous avons également investigué le mécanisme cellulaire responsable de l'internalisation du hPAFR-GyrB induite par la coumermycine dans des cellules COS-7 à l'aide d'études de microscopie confocale. Les résultats démontrent que la séquestration induite par la coumermycine se produit selon un mécanisme indépendant des β -arrestines 1 et 2 (Fig 6B de l'article) tandis que l'addition subséquente de l'agoniste entraîne une internalisation additionnelle du hPAFR-GyrB selon une voie dépendante des β -arrestines (Fig 6C de l'article). Nous n'avons pas observé de translocation des β -arrestines ni de colocalisation avec le récepteur lors de l'internalisation du hPAFR-GyrB induite par la coumermycine. Il a été rapporté que la fonction endocytaire de la β arr-1 est dépendante de son état de phosphorylation/déphosphorylation (Lin et al., 1997). Avant la stimulation par l'agoniste, la β arr-1 se retrouve dans le cytosol sous la forme d'une phosphoprotéine. La stimulation du β_2 AR par son agoniste entraîne ensuite la translocation de la β -arrestine 1 à la membrane plasmique et sa déphosphorylation subséquente. Cette étape est primordiale pour son interaction avec la clathrine car seule la forme déphosphorylée de la β -arrestine 1 est en mesure de fonctionner en tant que protéine adaptatrice de la clathrine responsable du ciblage des récepteurs désensibilisés vers les vésicules d'internalisation. La déphosphorylation de la sérine localisée à la position 412 de la queue C-terminale de la β -arrestine 1 altère possiblement la conformation et/ou la charge de cette région qui rend alors possible la liaison de sa partie C-terminale acide aux cages de clathrine. Il a également été démontré qu'une forme constitutivement phosphorylée de la β -arrestine, la β arr-1 S412D, se comporte comme un

mutant dominant négatif par rapport à l'internalisation du β_2 AR. La nature de la ou des kinase(s) responsable(s) de cette phosphorylation est encore inconnue (Lin et al., 1997). L'internalisation du hPAFR-GyrB indépendante de l'agoniste pourrait ainsi amener la phosphorylation de la β -arrestine 1 par la PKC et expliquer, par conséquent, sa localisation cytoplasmique suite au traitement à la coumermycine (Fig. 6B). De plus, le mécanisme enzymatique orchestrant la désensibilisation/internalisation du hPAFR-GyrB dépendante de la PKC pourrait également impliquer la phosphorylation directe du récepteur ou l'activation d'autres molécules de signalisation par la PKC. Nous ne pouvons pas non plus exclure la possibilité que la PKC puisse promouvoir la désensibilisation du hPAFR-GyrB par la phosphorylation de protéines adaptatrices qui pourraient contribuer au ciblage des récepteurs vers les vésicules endocytiques. Par exemple, il a été démontré que la protéine PICK1 appartenant à la famille des protéines PDZ et dont l'interaction avec la PKC était connue, interagit avec l'extrémité C-terminale de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA via son domaine PDZ, ce qui amène alors l'agglomération de cette sous-unité à l'intérieur des compartiments intracellulaires membranaires (Chung et al., 2000).

En plus de leur rôle bien établi en tant précurseur pour la génération de seconds messagers, il est maintenant évident que les lipides dérivés du phosphatidylinositol sont des composantes essentielles dans l'opération d'une grande étendue de fonctions cellulaires comme la régulation de l'adhésion cellulaire, l'assemblage du cytosquelette, la perméabilité des canaux ioniques ainsi qu'au niveau du transport vésiculaire (De Camilli et al., 1996; Toker et al., 1997; Martin, 1997; Baukrowitz et al., 1998). Les dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol peuvent se lier à au moins trois différents domaines de protéines, soit le domaine d'homologie à scr de type 2 (SH2), le domaine d'homologie à la pleckstrine (PH)

ainsi que les domaines de liaison aux phosphotyrosines (PTB) (Lemmon et al., 1995; Rameh et al., 1995; Zhou et al., 1995). En se liant à ces domaines, ces phospholipides pourraient ainsi contribuer au recrutement de protéines et coordonner, par conséquent, les interactions protéine-protéine régulant les événements endocytiques. L'implication potentielle de l'activation de la PLC dans le processus d'internalisation a tout d'abord été suggérée suite à l'observation que le complexe AP-2 pouvait se lier au phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Beck et al., 1991) et à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (Voglmaier et al., 1992). Il a été démontré que la majorité des récepteurs mutants du PAFR qui ne sont pas couplés aux protéines G manifestent une internalisation induite par l'agoniste altérée, sauf dans le cas du mutant Y293A qui adopte plutôt un mode de séquestration indépendant de la signalisation (Le Gouill et al., 1997). Dans cette présente étude, nous avons démontré que la séquestration du hPAFR-GyrB indépendante de l'agoniste induite par la coumermycine n'entraîne pas d'accumulation d'inositols phosphate (Fig. 7 de l'article), suggérant ainsi que l'activation de la PLC n'est pas impliquée dans ce mécanisme alternatif de séquestration. Des divergences similaires ont notamment été observées dans le cas du $AT_{1A}R$ et du récepteur m1 muscarinique d'où est découlée l'hypothèse selon laquelle l'internalisation des récepteur et l'activation de la PLC nécessitent des composantes structurales différentes (Moro et al., 1994; Hunyady et al., 1994).

E. Conclusion :

Dans ce projet de recherche, nous avons caractérisé et étudié l'implication de la dimérisation du récepteur du PAF dans un processus fonctionnel, l'internalisation. Nous avons ainsi démontré que la dimérisation du hPAFR pouvait se produire sous des conditions basales et que celle-ci est en partie gouvernée par des interactions covalentes. Nous avons également observé la formation d'un hétérodimère entre le hPAFR et le V₂R sans toutefois avoir été en mesure d'expliquer l'origine fonctionnelle de ce type d'interaction. Nous avons ensuite démontré que la dimérisation induite par la coumermycine d'un récepteur chimérique, le hPAFR-GyrB, est, à elle seule, suffisante pour induire son internalisation. Ce mécanisme d'internalisation indépendant du ligand se produit indépendamment des β -arrestines et de la formation des vésicules de clathrine. La PKC semble cependant être nécessaire à la désensibilisation structurale observée à la suite du traitement à la coumermycine. La présence de dimères endogènes non négligeable pourrait alors s'expliquer par le fait que la dimérisation, en elle seule, n'est pas suffisante pour induire l'activation de la PKC ou l'internalisation du récepteur qui sont plutôt amorcés suite à la dimérisation forcée induite par la coumermycine ou potentiellement par la liaison du ligand. L'oligomérisation pourrait également stabiliser l'interaction des récepteurs avec une machinerie endocytaire qui reste toutefois encore inconnue.

Afin de caractériser davantage les phénomènes observés, il serait pertinent d'étudier l'effet de la PKC sur le récepteur à l'aide d'essais de phosphorylation et d'isoler par la suite l'isoforme responsable à l'aide de différentes formes de PKC à phénotype dominant négatif. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la coumermycine sur la fonction du récepteur à l'aide d'essais de signalisation afin de voir si le couplage aux protéines G est affecté. L'étude

de la formation de dimères à l'aide de techniques sensibles au transfert d'énergie comme le FRET ou le BRET pourrait également être effectuée (Overton et al., 2000; Angers et al., 2000).

Étant donné que l'oligomérisation des GPCRs semble influencer certains aspects de la fonction des GPCRs, il ne serait donc pas surprenant de constater qu'un défaut de dimérisation pourrait potentiellement être attribué à certaines maladies humaines. Des évidences pharmacologiques suggèrent ainsi que la schizophrénie pourrait découler d'un niveau réduit de dimères du récepteur de la dopamine de type 2 (Nordstrom et al., 1995). De plus, il a été démontré que l'hétérodimérisation du CCR5 avec le $ccr5\Delta32$, une forme mutée du récepteur retrouvée chez les caucasiens, pourrait être l'explication moléculaire à l'origine de l'inhibition transdominante de l'infection par le HIV-1 chez les individus hétérozygotes (Benkirane et al., 1997). L'implication de la dimérisation dans l'internalisation des GPCRs n'a toutefois pas encore été amenée dans les diverses pathologies apparentées à cette grande famille de récepteurs.

F. ANNEXE

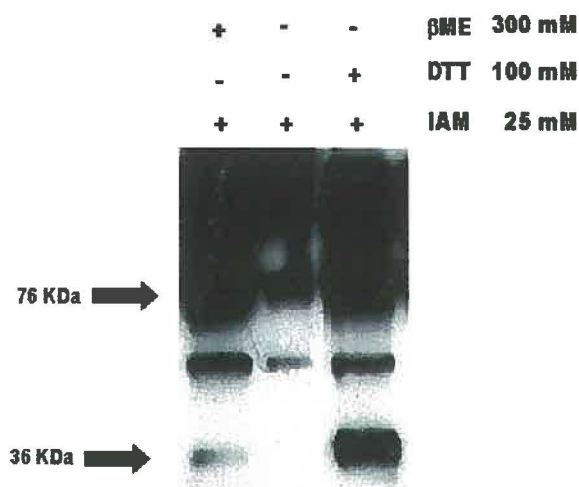


FIG. 9. Détection de dimères du récepteur du PAF sensibles aux conditions réductrices.

Les cellules COS-7 ont été transfectées avec le pcDNA3-c-*myc*-hPAFR de façon transitoire à l'aide du DEAE Dextran. Les cellules ont été mises en présence ou non d'iodoacétamide (IAM) pendant 1 h à la température de la pièce. L'IAM sert à alkyler les groupements sulfonyle libres pouvant potentiellement former des ponts disulfures non spécifiques lors de l'étape de solubilisation. Les récepteurs des lysats cellulaires ont été immunoprécipités à l'aide de l'anti-c-*myc* de souris et élués dans un tampon d'électrophorèse avec ou sans les agents réducteurs β -mercaptoéthanol (β ME) ou dithiothreitol (DTT). Suite à une préincubation de 30 min à la température ambiante, les échantillons ont été chargés sur un gel SDS-PAGE 10% et les récepteurs ont ensuite été immunodétectés à l'aide de l'anti-c-*myc* de souris. Le DTT et le β -mercaptoéthanol causent un changement de poids moléculaire apparent du récepteur dimérique vers une forme de plus faible poids moléculaire correspondant à la forme monomérique du récepteur. L'IAM n'a pas d'effet sur les bandes de haut poids moléculaire correspondant au récepteur en l'absence d'agents réducteurs.

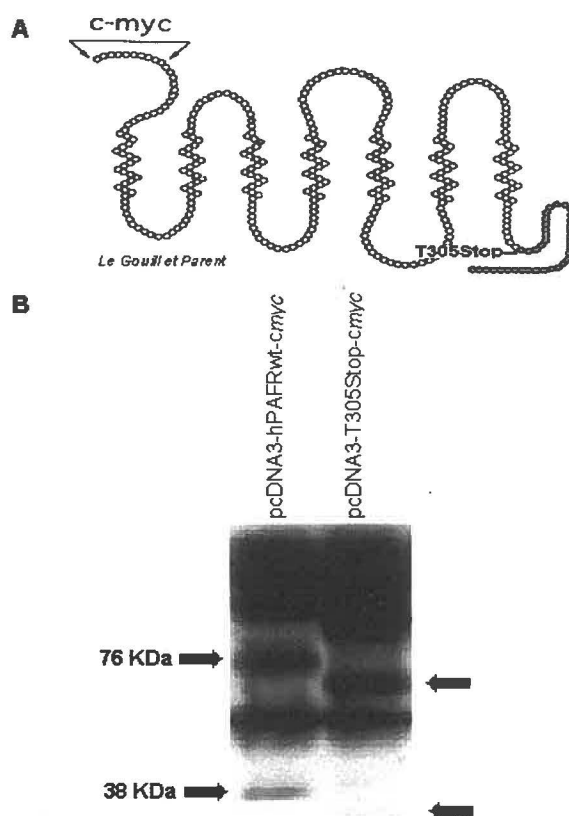


FIG. 10. Effet de la délétion de la queue C-terminale sur la dimérisation du hPAFR.

A, Représentation schématique du mutant T305Stop du hPAFR dont les 38 derniers acides aminés de la queue C-terminale ont été délétés. Les cercles noirs correspondent aux acides aminés enlevés. B, La queue C-terminale du hPAFR n'est pas essentielle à sa dimérisation. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec le pcDNA3-*c-myc*-hPAFR ou pcDNA3-*c-myc*-T305Stop de façon transitoire à l'aide du DEAE Dextran. Les cellules ont ensuite été lysées et les récepteurs ont été immunoprécipités à l'aide de l'anti-*c-myc* de souris. Les échantillons ont été chargés sur un gel SDS-PAGE 10% et transférés sur nitrocellulose. Les récepteurs ont été détectés à l'aide d'un immunobuvardage de type Western avec un anti-*c-myc* de souris. Les flèches désignent la position de la forme dimérique et monomérique des récepteurs respectifs.

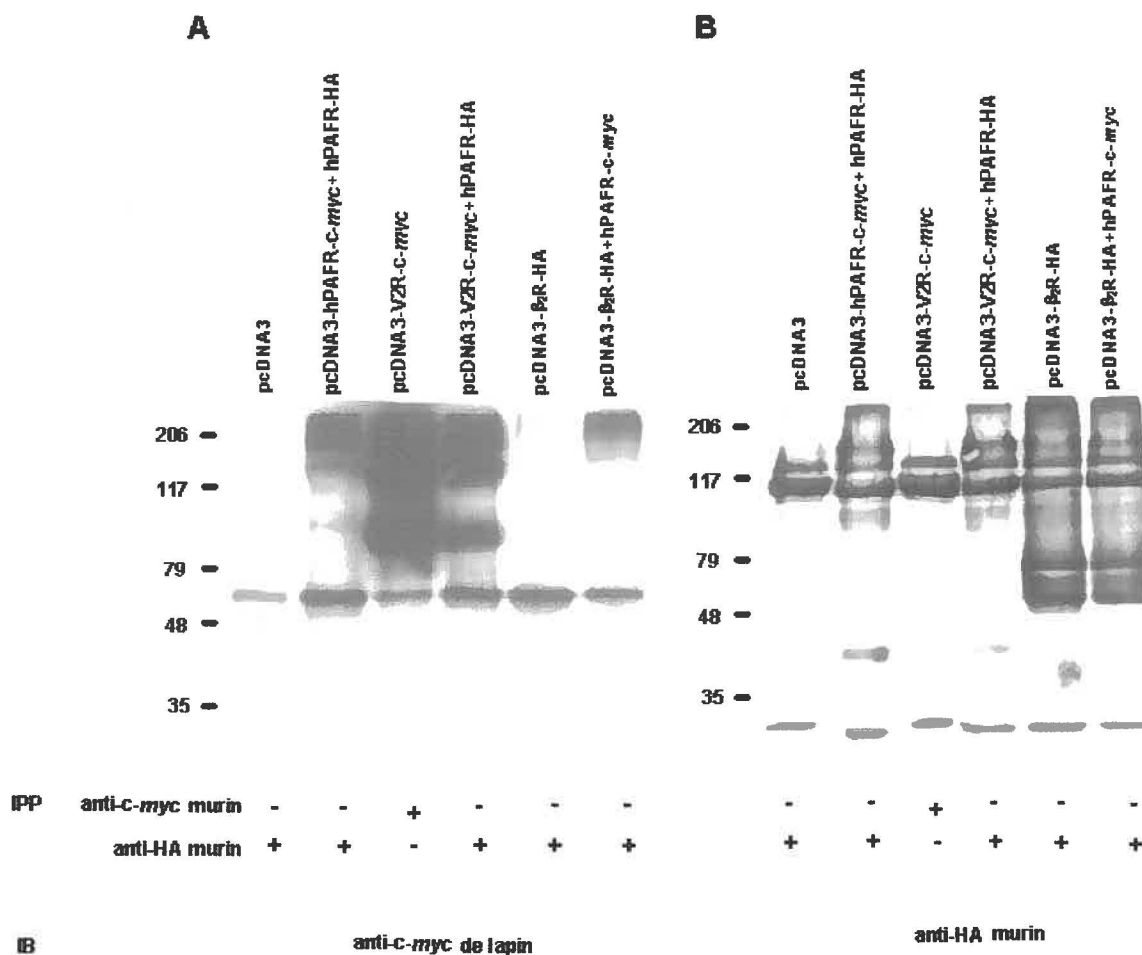


FIG 11. Formation d'hétérodimères hPAFR/V₂R dans les cellules COS-7. Immunoprécipitation de lysats de cellules COS-7 exprimant individuellement de façon transitoire le récepteur pcDNA3-V₂R-c-myc ou pcDNA3β₂AR-HA et en combinaison avec le pcDNA3-hPAFR-HA ou pcDNA3-hPAFR-c-myc, respectivement. La cotransfection pcDNA-hPAFR-c-myc et pcDNA3-hPAFR-HA constitue le témoin positif. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel SDS-PAGE 10%, transférés sur nitrocellulose et immunodétectés avec l'anti-c-myc de lapin (A) ou l'anti-HA de lapin (B).

G. Remerciements :

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Marek Rola-Pleszczynski, pour m'avoir fait connaître le monde des GPCR et la fascination pour la recherche.

Je tiens également à remercier les Dr. Gaëtan Guillemette et Dr. Jean-Luc Parent pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire de maîtrise.

Je voudrais aussi remercier le Dr. Gilles Dupuis pour ses précieux conseils techniques ainsi que Brian Holleran et Élie Barbar pour nos discussions scientifiques fort intéressantes. Je tiens également à souligner l'aide technique exceptionnelle de Denis Gingras et les conversations paramédicales téléphoniques avec mon père, sans oublier ma mère, ma motivatrice. Et finalement, mon assistant de recherche personnel qui m'a aidée et supportée dans la complétion de mes dernières expériences de recherche au labo qui se sont parfois terminées aux petites heures du matin.

H. Bibliographie :

AbdAlla, S., Jarnagin, K., Muller-Esterl, W. et Quitterer, U. The N-terminal amino group of [Tyr8]bradykinin is bound adjacent to analogous amino acids of the human and rat B2 receptor. 1996. *J Biol Chem* **271**: 27382-7.

AbdAlla, S., Zaki, E., Lothar, H. et Quitterer, U. Involvement of the amino terminus of the B(2) receptor in agonist-induced receptor dimerization. 1999. *J Biol Chem* **274**: 26079-84.

AbdAlla, S., Lothar, H. et Quitterer, U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. 2000. *Nature* **407**: 94-8.

Abdelhamid, E. E., Sultana, M., Portoghese, P. S. et Takemori, A. E. Selective blockage of delta opioid receptors prevents the development of morphine tolerance and dependence in mice. 1991. *J Pharmacol Exp Ther* **258**: 299-303.

Ali, H., Richardson, R. M., Tomhave, E. D., DuBose, R. A., Haribabu, B. et Snyderman, R. Regulation of stably transfected platelet activating factor receptor in RBL-2H3 cells. Role of multiple G proteins and receptor phosphorylation. 1994. *J Biol Chem* **269**: 24557-63.

Ali, H., Fisher, I., Haribabu, B., Richardson, R. M. et Snyderman, R. Role of phospholipase Cbeta3 phosphorylation in the desensitization of cellular responses to platelet-activating factor. 1997. *J Biol Chem* **272**: 11706-9.

Ali, J. A., Jackson, A. P., Howells, A. J. et Maxwell, A. The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. 1993. *Biochemistry* **32**: 2717-24.

Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairer, S., Chelsky, D., Dennis, M. et Bouvier, M. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). 2000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3684-9.

Aramori, I., Ferguson, S. S., Bieniasz, P. D., Zhang, J., Cullen, B. et Cullen, M. G. Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. 1997. *EMBO J* **16**: 4606-16.

Avissar, S., Amitai, G. et Sokolovsky, M. Oligomeric structure of muscarinic receptors is shown by photoaffinity labeling: subunit assembly may explain high- and low-affinity agonist states. 1983. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 156-9.

Bai, M., Trivedi, S. et Brown, E. M. Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. 1998. *J Biol Chem* **273**: 23605-10.

Barak, L. S., Ferguson, S. S., Zhang, J. et Caron, M. G. A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. 1997. *J Biol Chem* **272**: 27497-500.

Barak, L. S., Warabi, K., Feng, X., Caron, M. G. et Kwatra, M. Real-time visualization of the cellular redistribution of G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 during homologous desensitization of the substance P receptor. 1999. *J Biol Chem* **274**: 7565-9.

Baukrowitz, T., Schulte, U., Oliver, D., Herlitze, S., Krauter, T., Tucker, S. J., Ruppersberg, J. P. et Fakler, B. PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. 1998. *Science* **282**: 1141-4.

Beck, K. A. et Keen, J. H. Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. 1991. *J Biol Chem* **266**: 4442-7.

Benkirane, M., Jin, D. Y., Chun, R. F., Koup, R. A. et Jeang, K. T. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. 1997. *J Biol Chem* **272**: 30603-6.

Benovic, J. L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G. et Lefkowitz, R. J. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). 1987. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8879-82.

Benveniste, J., Henson, P. M. et Cochrane, C. G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. 1972. *J Exp Med* **136**: 1356-77.

Benveniste, J., Tence, M., Varenne, P., Bidault, J., Boullet, C. et Polonsky, J. Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine. 1979. *C R Seances Acad Sci D* **289**: 1037-40.

Berridge, M. J., Dawson, R. M., Downes, C. P., Heslop, J. P. et Irvine, R. F. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. 1983. *Biochem J* **212**: 473-82.

Bhatnagar, A., Willins, D. L., Gray, J. A., Woods, J., Benovic, J. L. et Roth, B. L. The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT_{2A} receptors during endocytosis. 2001. *J Biol Chem* **276**: 8269-77.

Bito, H. et Shimizu, T. Molecular characterization and physiological functions of PAF receptors. 1997. *Adv Exp Med Biol* **400A**: 215-21.

Blank, M. L., Snyder, F., Byers, L. W., Brooks, B. et Muirhead, E. Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. 1979. *Biochem Biophys Res Commun* **90**: 1194-200.

Bohm, S. K., Grady, E. F. et Bunnett, N. W. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. 1997. *Biochem J* **322**: 1-18.

Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Blasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G. et Lefkowitz, R. J. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. 1988. *Nature* **333**: 370-3.

Bünemann, M. et Hosey, M. M. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. 1999. *J Physiol* **517**: 5-23.

Camussi, G., Aglietta, M., Malavasi, F., Tetta, C., Piacibello, W., Sanavio, F. et Bussolino, F. The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. 1983. *J Immunol* **131**: 2397-403.

Camussi, G., Tetta, C. et Baglioni, C. The role of platelet-activating factor in inflammation. 1990. *Clin Immunol Immunopathol* **57**: 331-8.

Chao, W., Liu, H., Hanahan, D. J. et Olson, M. S. Regulation of platelet-activating factor receptor and PAF receptor-mediated arachidonic acid release by protein kinase C activation in rat Kupffer cells. 1990. *Arch Biochem Biophys* **282**: 188-97.

Chao, W. et Olson, M. S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. 1993. *Biochem J* **292**: 617-29.

Chuang, T. T., LeVine, H. et De Blasi, A. Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. 1995. *J Biol Chem* **270**: 18660-5.

Chun, M., Liyanage, U. K., Lisanti, M. P. et Lodish, H. F. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. 1994. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11728-32.

Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E. et Schmid, S. L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. 1994. *J Cell Biol* **127**: 915-34.

De Camilli, P., Emr, S. D., McPherson, P. S. et Novick, P. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. 1996. *Science* **271**: 1533-9.

De Weerd, W. F et Leeb-Lundberg, L. M. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. 1997. *J Biol Chem* **272**: 17858-66.

Demopoulos, C. A., Pinckard, R. N. et Hanahan, D. J. Platelet-activating factor: evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). 1979. *J Biol Chem* **254**: 9355-8.

Diviani, D., Lattion, A. L. et Cotecchia, S. Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. 1997. *J Biol Chem* **272**: 28712-9.

Evangelou, A. M. Platelet-activating factor (PAF): implications for coronary heart and vascular diseases. 1994. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **50**: 1-28.

Exton, J. H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. 1994. *Biochim Biophys Acta* **1212**: 26-42.

Farrar, M. A., Alberol-Ila, et Perlmutter, R. M. Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. 1996. *Nature* **383**: 178-81.

Ferguson, S. S., Menard, L., Barak, L. S., Koch, W. J., Colapietro, A. M. et Caron, M. G. Role of phosphorylation in agonist-promoted beta 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta ARK1. 1995. *J Biol Chem* **270**: 24782-9. 37.

Ferguson, S. S., Downey, W. E. 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L., and Caron, M. G. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. 1996. *Science* **271**: 363-6.

Ferguson, S. S., Barak, L. S., Zhang, J. et Caron, M. G. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. 1996. *Can J Physiol Pharmacol* **74**: 1095-110.

Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. 2001. *Pharmacol Rev* **53**: 1-24.

Feron, O., Smith, T. W., Michel, T. et Kelly, R. A. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. 1997. *J Biol Chem* **272**: 17744-8.

Fields, T. A. et Casey, P. J. Phosphorylation of Gz alpha by protein kinase C blocks interaction with the beta gamma complex. 1995. *J Biol Chem* **270**: 23119-25.

Freedman, N. J. et Lefkowitz, R. J. Desensitization of G protein-coupled receptors. 1996. *Recent Prog Horm Res* **51**: 319-51.

Garcia Rodriguez, C., Cundell, D. R., Tuomanen, E. I., Kolakowski, L. F. Jr, Gerard, C. et Gerard, N. P. The role of N-glycosylation for functional expression of the human platelet-activating factor receptor: glycosylation is required for efficient membrane trafficking. 1995. *J Biol Chem* **270**: 25178-84.

Gellert, M., Fisher, L. M. et O'Dea, M. H. DNA gyrase: purification and catalytic properties of a fragment of gyrase B protein. 1979. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 6289-93.

George, S. R., Lee, S. P., Varghese, G., Zeman, P. R., Seeman, P., Ng, G. Y. et O'Dowd, B. F. A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. 1998. *J Biol Chem* **273**: 30244-8.

Gerard, N. P. et Gerard, C. Receptor-dependent internalization of platelet-activating factor. 1994. *J Immunol* **152**: 793-800.

Gether, U. et Kobilka, B. K. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. 1998. *J Biol Chem* **273**: 17979-82.

Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. 2000. *Endocr Rev* **21**: 90-113.

Gilbert, E. J. et Maxwell, A. The 24 kDa N-terminal sub-domain of the DNA gyrase B protein binds coumarin drugs. 1994. *Mol Microbiol* **12**: 365-73.

Gilbert, T. L., Bennett, T. A., Maestas, D. C., Cimino, D. F. et Prossnitz, E. R. Internalization of the human N-formyl peptide and C5a chemoattractant receptors occurs via clathrin-independent mechanisms. 2001. *Biochemistry* **40**: 3467-75.

Gilman, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. 1987. *Annu Rev Biochem* **56**: 615-49.

Godfrey, J. C. et Price, K. E. Structure-activity relationships in coumermycins. 1972. *Adv Appl Microbiol* **15**: 231-96.

Gomes, I., Jordan, B. A., Gupta, A., Trapaidze, N., Nagy, V. et Devi, L. A. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. 2000. *J Neurosci* **20**: RC110.

Gomes, I., Jordan, B. A., Gupta, A., Rios, C., Trapaidze, N. et Devi, L. A. G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. 2001. *J Mol Med* **79**: 226-42.

Goodman, O. B. Jr, Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. et Benovic, J. L. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. 1996. *Nature* **383**: 447-50.

Gurevich, V. V., Chen, C. Y., Kim, C. M. et Benovic, J. L. Visual arrestin binding to rhodopsin. Intramolecular interaction between the basic N terminus and acidic C terminus of arrestin may regulate binding selectivity. 1994. *J Biol Chem* **269**: 8721-7.

Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K. et Uchiyama, H. Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. 1996. *J Biol Chem* **271**: 2776-82.

Hamm, H. E. The many faces of G protein signaling. 1998. *J Biol Chem* **273**: 669-72.

Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G. et Lefkowitz, R. J. Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. 1989. *J Biol Chem* **264**: 12657-65.

Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., et Bouvier, M. A peptide derived from a β_2 -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. 1996. *J Biol Chem* **271**: 16384-92.

Hebert, T. E., Loisel, T. P., Adam, L., Ethier, N., Onge, S. S. et Bouvier, M. Functional rescue of a constitutively desensitized β_2 AR through receptor dimerization. 1998. *Biochem J* **330**: 287-93.

Heldin, C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. 1995. *Cell* **80**: 213-23.

Hipkin, R. W., Wang, Y. et Schonbrunn, A. Protein kinase C activation stimulates the phosphorylation and internalization of the sst2A somatostatin receptor. 2000. *J Biol Chem* **275**: 5591-9.

Hunyady, L., Baukal, A. J., Balla, T. et Catt, K. J. Independence of type I angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. 1994. *J Biol Chem* **269**: 24798-804.

Hunyady, L., Bor, M., Balla, T. et Catt, K. J. Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. 1994. *J Biol Chem* **269**: 31378-82.

Inglese, J., Freedman, N. J., Koch, W. J. et Lefkowitz, R. J. Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. 1993. *J Biol Chem* **268**: 23735-8.

Ishii, I., Izumi, T., Tsukamoto, H., Umeyama, H., Ui, M. et Shimizu, T. Alanine exchanges of polar amino acids in the transmembrane domains of a platelet-activating factor receptor generate both constitutively active and inactive mutants. 1997. *J Biol Chem* **272**: 7846-54.

Ishii, I., Saito, E., Izumi, T., Ui, M. et Shimizu, T. Agonist-induced sequestration, recycling, and resensitization of platelet-activating factor receptor. Role of cytoplasmic tail phosphorylation in each process. 1998. *J Biol Chem* **273**: 9878-85.

Ishii, S. et Shimizu, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. 2000. *Prog Lipid Res* **39**: 41-82.

Izumi, T. et Shimizu, T. Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. 1995. *Biochim Biophys Acta* **1259**: 317-33.

Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M., Yao, W. J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L. Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J. A., Morse, K., Laz, T., Smith, K. E., Nagarathnam, D., Noble, S. A., Branchek, T. A. et Gerald, C. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. 1998. *Nature* **396**: 674-9.

Jordan, B. A. et Devi, L. A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. 1999. *Nature* **399**: 697-700.

Jordan, B. A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R. et Devi, L. A. Oligomerization of opioid receptors with β_2 -adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. 2001. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 343-8.

Kamata, K., Numazawa, T. et Kasuya, Y. Mechanisms of desensitization of vasodilatation induced by platelet-activating factor in hypertensive rats. 1996. *Eur J Pharmacol* **301**: 121-8.

Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. et Bettler, B. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. 1998. *Nature* **396**: 683-7.

Kawaguchi, H. et Yasuda, H. Platelet-activating factor stimulates prostaglandin synthesis in cultured cells. 1986. *Hypertension* **8**: 192-7.

Keith, D. E., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., Kang, L., Evans, C. J., et von Zastrow, M. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. 1996. *J Biol Chem* **271**: 19021-4.

Koch, W. J., Inglese, J., Stone, W. C. et Lefkowitz, R. J. The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. 1993. *J Biol Chem* **268**: 8256-60.

Koenig, J. A. et Edwardson, J. M. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. 1997. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 276-87.

Krupnick, J. G. et Benovic, J. L. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. 1998. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 289-319.

Kuner, R., Kohr, G., Grunewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A. et Kornau, H. C. Role of heteromer formation in GABAB receptor function. 1999. *Science* **283**: 74-7.

Laage, R., Rohde, J., Brosig, B. et Langosch, D. A conserved membrane-spanning amino acid motif drives homomeric and supports heteromeric assembly of presynaptic SNARE proteins. 2000. *J Biol Chem* **275**: 17481-7.

Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G. et Barak, L. S. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3712-7.

Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S. et Caron, M. G. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta₂-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. 2000. *J Biol Chem* **275**: 23120-6.

Law, P. Y., McGinn, T. M., Wick, M. J., Erikson, L. J., Evans, C. et Loh, H. H. Analysis of delta-opioid receptor activities stably expressed in CHO cell lines: function of receptor density? 1994. *J Pharmacol Exp Ther* **271**: 1686-94.

Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M. et Stankova, J. Role of the Cys90, Cys95 and Cys173 residues in the structure and function of the human platelet-activating factor receptor. 1997. *FEBS Lett* **402**: 203-8.

Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M. et Stankova, J. Structural and functional requirements for agonist-induced internalization of the human platelet-activating factor receptor. 1997b. *J Biol Chem* **272**: 21289-95.

Le Gouill, C., Parent, J. L., Caron, C. A., Gaudreau, R., Volkov, L., Rola-Pleszczynski, M., et Stankova, J. Selective modulation of wild type receptor functions by mutants of G-protein-coupled receptors. 1999. *J Biol Chem* **274**: 12548-54.

Lee, K. B., Pals-Rylaarsdam, R., Benovic, J. L. et Hosey, M. M. Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. 1998. *J Biol Chem* **273**: 12967-72.

Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptor kinases. 1993. *Cell* **74**: 409-12.

Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. 1998. *J Biol Chem* **273**: 18677-80.

Lemmon, M. A., Flanagan, J. M., Treutlein, H. R., Zhang, J. et Engelman, D. M. Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices. 1992. *Biochemistry* **31**: 12719-25.

Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., O'Brien, R., Sigler, P. B. et Schlessinger, J. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. 1995. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10472-6.

Li, X., Steeber, D. A., Tang, M. L., Farrar, M. A., Perlmutter, R. M. et Tedder, T. F. Regulation of L-selectin-mediated rolling through receptor dimerization. 1998. *J Exp Med* **188**: 1385-90.

Liang, M., Eason, M. G., Jewell-Motz, E. A., Williams, M. A., Theiss, C. T., Dorn, G. W. et Liggett, S. B. Phosphorylation and functional desensitization of the alpha_{2A}-adrenergic receptor by protein kinase C. 1998. *Mol Pharmacol* **54**: 44-9.

Lin, F. T., Krueger, K. M., Kendall, H. E., Daaka, Y., Fredericks, Z. L., Pitcher, J. A. et Lefkowitz, R. J. Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. 1997. *J Biol Chem* **272**: 31051-7.

Liu, B., Nakashima, S., Adachi, T., Ito, Y., Takano, T., Shimizu, T. et Nozawa, Y. Prolonged activation of phospholipase D in Chinese hamster ovary cells expressing platelet-activating-factor receptor lacking cytoplasmic C-terminal tail. 1997. *Biochem J* **327**: 239-44.

Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G. et Lefkowitz, R. J. Multiple pathways of rapid beta₂-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. 1990. *J Biol Chem* **265**: 3202-11.

Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. et Lefkowitz, R. J. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. 1990b. *Science* **248**: 1547-50.

Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G. et Lefkowitz, R. J. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. 1992. *J Biol Chem* **267**: 8558-64.

Lotner, G. Z., Lynch, J. M., Betz, S. J. et Henson, P. M. Human neutrophil-derived platelet activating factor. 1980. *J Immunol* **124**: 676-84.

Lukashova, V., Asselin, C., Krolewski, J. J., Rola-Pleszczynski, M. et Stankova, J. G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor. 2001. *J Biol Chem* **276**: 24113-21.

MacKenzie, K. R., Prestegard, J. H. et Engelman, D. M. A transmembrane helix dimer: structure and implications. 1997. *Science* **276**: 131-3.

Martin, T. F. Thyrotropin-releasing hormone rapidly activates the phosphodiester hydrolysis of polyphosphoinositides in GH3 pituitary cells. Evidence for the role of a polyphosphoinositide-specific phospholipase C in hormone action. 1983. *J Biol Chem* **258**: 14816-22.

Martin, T. F. Phosphoinositides as spatial regulators of membrane traffic. 1997. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 331-8.

Mattera, R., Pitts, B. J., Entman, M. L. et Birnbaumer, L. Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. Evidence for homo- and heterotropic cooperativity in ligand binding analyzed by computer-assisted curve fitting. 1985. *J Biol Chem* **260**: 7410-21.

Maxwell, A. The molecular basis of quinolone action. 1992. *J Antimicrob Chemother* **30**: 409-14.

Maxwell, A. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. 1993. *Mol Microbiol* **9**: 681-6.

McConalogue, K., Dery, O., Lovett, M., Wong, H., Walsh, J. H., Grady, E. F. et Bunnett, N. W. Substance P-induced trafficking of beta-arrestins. The role of beta-arrestins in endocytosis of the neurokinin-1 receptor. 1999. *J Biol Chem* **274**: 16257-68.

McManus, L. M. et Pinckard, R. N. Kinetics of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC)-induced acute lung alterations in the rabbit. 1985. *Am J Pathol* **121**: 55-68.

Miike, S., Kurasawa, K., Saito, Y. et Iwamoto, I. Platelet-activating factor activates mitogen-activated protein kinases through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine kinase in human eosinophils. 2000. *J Leukoc Biol* **67**: 117-26.

Mohi, M. G., Arai, K. I. et Watanabe, S. Activation and functional analysis of Janus kinase 2 in BA/F3 cells using the coumermycin/gyrase B system. 1998. *Mol Biol Cell* **9**: 3299-308.

Mohler, H., Luscher, B., Fritschy, J. M., Benke, D., Benson, J. et Rudolph, U. GABA(A)-receptor assembly in vivo: lessons from subunit mutant mice. 1998. *Life Sci* **62**: 1611-5.

Monnot, C., Bihoreau, C., Conchon, S., Curnow, K. M., Corvol, P. et Clauser, E. Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants. 1996. *J Biol Chem* **271**: 1507-13.

Montrucchio, G., Alloatti, G. et Camussi, G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. 2000. *Physiol Rev* **80**: 1669-99.

Moro, O., Shockley, M. S., Lamah, J. et Sadee, W. Overlapping multi-site domains of the muscarinic cholinergic Hm1 receptor involved in signal transduction and sequestration. 1994. *J Biol Chem* **269**: 6651-5.

Nakata, H., Kameyama, K., Haga, K. et Haga, T. Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype). 1994. *Eur J Biochem* **220**: 29-36.

Ng, G. Y., O'Dowd, B. F., Lee, S. P., Chung, H. T., Brann, M. R., Seeman, P. et George, S. R. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. 1996. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 200-4.

Nimchinsky, E. A., Hof, P. R., Janssen, W. G., Morrison, J. H. et Schmauss, C. Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. 1997. *J Biol Chem* **272**: 29229-37.

Nordstrom, A. L., Farde, L., Eriksson, L. et Halldin, C. No elevated D2 dopamine receptors in neuroleptic-naïve schizophrenic patients revealed by positron emission tomography and [¹¹C]N-methylspiperone. 1995. *Psychiatry Res* **61**: 67-83.

Numberg, B. et Ahnert-Hilger, G. Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system. 1996. *FEBS Lett* **389**: 61-5.

O'Farrell, A. M., Liu, Y., Moore, K. W. et Mui, A. L. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. 1998. *EMBO J* **17**: 1006-18.

O'Flaherty, J. T., Jacobson, D. P. et Redman, J. F. Regulation of platelet-activating-factor receptors and the desensitization response in polymorphonuclear neutrophils. 1992. *Biochem J* **288**: 241-8.

Okayasu, T., Hasegawa, K. et Ishibashi, T. Platelet-activating factor stimulates metabolism of phosphoinositides via phospholipase A2 in primary cultured rat hepatocytes. 1987. *J Lipid Res* **28**: 760-7.

Overton, M. C. et Blumer, K. J. G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. 2000. *Curr Biol* **10**: 341-4.

Pace, A. J., Gama, L. et Breitwieser, G. E. Dimerization of the calcium-sensing receptor occurs within the extracellular domain and is eliminated by Cys --> Ser mutations at Cys101 and Cys236. 1999. *J Biol Chem* **274**: 11629-34.

Pals-Rylaarsdam, R., Gurevich, V. V., Lee, K. B., Ptasienski, J. A., Benovic, J. L. et Hosey, M. M. Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. 1997. *J Biol Chem* **272**: 23682-9.

Parent, J. L., Le Gouill, C., de Brum-Fernandes, A. J., Rola-Pleszczynski, M. et Stankova, J. Mutations of two adjacent amino acids generate inactive and constitutively active forms of the human platelet-activating factor receptor. 1996. *J Biol Chem* **271**: 7949-55.

Parent, J. L., Gouill, C. L., Escher, E., Rola-Pleszczynski, M. et Stakova, J. Identification of transmembrane domain residues determinant in the structure-function relationship of the human platelet-activating factor receptor by site-directed mutagenesis. 1996b. *J Biol Chem* **271**: 23298-303.

Peplow, P. V. Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers. 1999. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **61**: 65-82.

Pfister, C., Chabre, M., Plouet, J., Tuyen, V. V., De Kozak, Y., Faure, J. P. et Kuhn, H. Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. 1985. *Science* **228**: 891-3.

Potter, L. T., Ballesteros, L. A., Bichajian, L. H., Ferrendelli, C. A., Fisher, A., Hanchett, H. E. et Zhang, R. Evidence of paired m2 muscarinic receptors. 1991. *Mol Pharmacol* **39**: 211-21.

Premont, R. T., Inglese, J. et Lefkowitz, R. J. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. 1995. *FASEB J* **9**: 175-82.

Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M. et McIntyre, T. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. 2000. *Annu Rev Biochem* **69**: 419-45.

Pronin, A. N. et Benovic, J. L. Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. 1997. *J Biol Chem* **272**: 3806-12.

Rameh, L. E., Chen, C. S. et Cantley, L. C. Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. 1995. *Cell* **83**: 821-30.

Reece, R. J. et Maxwell, A. Tryptic fragments of the Escherichia coli DNA gyrase A protein. 1989. *J Biol Chem* **264**: 19648-53.

Reece, R. J. et Maxwell, A. DNA gyrase: structure and function. 1991. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **26**: 335-75.

Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Patel, S. C., Patel, R. C. et Patel, Y. C. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. 2000. *Science* **288**: 154-7.

Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., de Ana, A. M., Albar, J. P., Martinez-A, C. et Mellado, M. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3628-33.

Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Martin, A., Nieto, M., Sanchez-Madrid, F., Proudfoot, A. E., Wells, T. N., Martinez-A, C. et Mellado, M. Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. 1999. *J Cell Biol* **144**: 755-65.

Romano, C., Yang, W. L. et O'Malley, K. L. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. 1996. *J Biol Chem* **271**: 28612-6.

Ryu, S. H., Kim, U. H., Wahl, M. I., Brown, A. B., Carpenter, G., Huang, K. P. et Rhee, S. G. Feedback regulation of phospholipase C-beta by protein kinase C. 1990. *J Biol Chem* **265**: 17941-5.

Salahpour, A., Angers, S. et Bouvier, M. Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. 2000. *Trends Endocrinol Metab* **11**: 163-8.

Schoneberg, T., Yun, J., Wenkert, D. et Wess, J. Functional rescue of mutant V2 vasopressin receptors causing nephrogenic diabetes insipidus by a co-expressed receptor polypeptide. 1996. *EMBO J* **15**: 1283-91.

Schwiebert, E. M., Karlson, K. H., Friedman, P. A., Dietl, P., Spielman, W. S. et Stanton, B. A. Adenosine regulates a chloride channel via protein kinase C and a G protein in a rabbit cortical collecting duct cell line. 1992. *J Clin Invest* **89**: 834-41.

Shimizu, T., Mutoh, H. et Kato, S. Platelet-activating factor receptor. Gene structure and tissue-specific regulation. 1996. *Adv Exp Med Biol* **416**: 79-84.

Shukla, S. D. Inositol phospholipid turnover in PAF transmembrane signalling. 1991. *Lipids* **26**: 1028-33.

Sinkins, W. G. et Wells, J. W. G protein-linked receptors labeled by [³H]histamine in guinea pig cerebral cortex. II. Mechanistic basis for multiple states of affinity. 1993. *Mol Pharmacol* **43**: 583-94.

Snyder, F. Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. 1990. *Am J Physiol* **259**: C697-708.

Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. et Rothman, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. 1993. *Cell* **75**: 409-18.

Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. et Rothman, J. E. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. 1993b. *Nature* **362**: 318-24.

Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L. et Crabtree, G. R. Controlling signal transduction with synthetic ligands. 1993. *Science* **262**: 1019-24.

Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. et Prescott, S. M. Platelet-activating factor acetylhydrolases. 1997. *J Biol Chem* **272**: 17895-8.

Stoddard, B. L., Biemann, H. P. et Koshland, D. E. Jr. Receptors and transmembrane signaling. 1992. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**: 1-15.

Takano, T., Honda, Z., Sakanaka, C., Izumi, T., Kameyama, K., Haga, K., Haga, T., Kurokawa, K. et Shimizu, T. Role of cytoplasmic tail phosphorylation sites of platelet-activating factor receptor in agonist-induced desensitization. 1994. *J Biol Chem* **269**: 22453-8.

Tang, H., Guo, D. F., Porter, J. P., Wanaka, Y. et Inagami, T. Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. 1998. *Circ Res* **82**: 523-31.

Thivierge, M., Parent, J. L., Stankova, J. et Rola-Pleszczynski, M. Modulation of human platelet-activating factor receptor gene expression by protein kinase C activation. 1996. *J Immunol* **157**: 4681-7.

Toker, A. et Cantley, L. C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. 1997. *Nature* **387**: 673-6.

Traynor, J. R. et Elliott, J. delta-Opioid receptor subtypes and cross-talk with mu-receptors. 1993. *Trends Pharmacol Sci* **14**: 84-6.

Triggiani, M., Goldman, D. W. et Chilton, F. H. Biological effects of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in the human neutrophil. 1991. *Biochim Biophys Acta* **1084**: 41-7.

Tsao, P. et von Zastrow, M. Downregulation of G protein-coupled receptors. 2000. *Curr Opin Neurobiol* **10**: 365-9.

Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Kurose, H. et Nagao, T. Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G protein-coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2. 1994. *J Biol Chem* **269**: 32522-7.

Vazquez-Prado, J., Medina, L. C. et Garcia-Sainz, J. A. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. 1997. *J Biol Chem* **272**: 27330-7.

Venable, M. E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. et Prescott, S. M. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. 1993. *J Lipid Res* **34**: 691-702.

Vickery, R. G. et von Zastrow, M. Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. 1999. *J Cell Biol* **144**: 31-43.

Vogler, O., Bogatkewitsch, G. S., Wriske, C., Krummenerl, P., Jakobs, K. H. et van Koppen, C. J. Receptor subtype-specific regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration by dynamin. Distinct sequestration of m2 receptors. 1998. *J Biol Chem* **273**: 12155-60.

Vogler, O., Nolte, B., Voss, M., Schmidt, M., Jakobs, K. H. et van Koppen, C. J. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin. 1999. *J Biol Chem* **274**: 12333-8.

Voglmaier, S. M., Keen, J. H., Murphy, J. E., Ferris, C. D., Prestwich, G. D., Snyder, S. H. et Theibert, A. B. Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. 1992. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 158-63.

Walker, J. K., Premont, R. T., Barak, L. S., Caron, M. G. et Shetzline, M. A. Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor. 1999. *J Biol Chem* **274**: 31515-23.

Werbonat, Y., Kleutges, N., Jakobs, K. H. et van Koppen, C. J. Essential role of dynamin in internalization of m2 muscarinic acetylcholine and angiotensin AT_{1A} receptors. 2000. *J Biol Chem* **275**: 21969-74.

White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M. et Marshall, F. H. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. 1998. *Nature* **396**: 679-82.

Willardson, B. M., Pou, B., Yoshida, T. et Bitensky, M. W. Cooperative binding of the retinal rod G-protein, transducin, to light-activated rhodopsin. 1993. *J Biol Chem* **268**: 6371-82.

Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E. et Lohse, M. J. Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. 1996. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2105-9.

Wreggett, K. A. et Wells, J. W. Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. 1995. *J Biol Chem* **270**: 22488-99.

Xiang, B., Yu, G. H., Guo, J., Chen, L., Hu, W., Pei, G. et Ma, L. Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. 2001. *J Biol Chem* **276**: 4709-16.

Ye, R. D., Prossnitz, E. R., Zou, A. H. et Cochrane, C. G. Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor. 1991. *Biochem Biophys Res Commun* **180**: 105-11.

Zeng, F. et Wess, J. Molecular aspects of muscarinic receptor dimerization. 2000. *Neuropsychopharmacology* **23**: S19-31.

Zeng, F. Y. et Wess, J. Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. 1999. *J Biol Chem* **274**: 19487-97.

Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Menard, L. et Caron, M. G. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. 1996. *J Biol Chem* **271**: 18302-5.

Zhang, J., Barak, L. S., Anborgh, P. H., Laporte, S. A., Caron, M. G. et Ferguson, S. S. Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. 1999. *J Biol Chem* **274**: 10999-1006.

Zhang, Z., Sun, S., Quinn, S. J., Brown, E. M. et Bai, M. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. 2001. *J Biol Chem* **276**: 5316-22.

Zhou, M. M., Ravichandran, K. S., Olejniczak, E. F., Petros, A. M., Meadows, R. P., Sattler, M., Harlan, J. E., Wade, W. S., Burakoff, S. J. et Fesik, S. W. Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. 1995. *Nature* **378**: 584-92.

Zhou, W. et Olson, M. S. A mechanism for phorbol ester-mediated regulation of the PAF receptor in human neutrophils. 1994. *Arch Biochem Biophys* **313**: 179-83.

Zhu, Y., King, M. A., Schuller, A. G., Nitsche, J. F., Reidl, M., Elde, R. P., Unterwald, E., Pasternak, G. W. et Pintar, J. E. Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. 1999. *Neuron* **24**: 243-52.